

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 240**

51 Int. Cl.:

A61K 36/537 (2006.01)

A61K 36/258 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2001 E 01994322 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1351698**

54 Título: **Composición herbaria para la angina de pecho, procedimiento para prepararla y sus usos**

30 Prioridad:

22.12.2000 US 258057 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.05.2013

73 Titular/es:

**TASLY PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.
(100.0%)
No. 1, Liaohedong Road, Xinyibai Avenue,
Beichen District
Tianjin 300402 , CN**

72 Inventor/es:

**YAN, XIJUN;
WU, NAIFENG;
GUO, ZHIXIN;
YE, ZHENGLIANG y
LIU, YAN**

74 Agente/Representante:

ÁLVAREZ LÓPEZ, Fernando

ES 2 403 240 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición herbaria para la angina de pecho, procedimiento para prepararla y sus usos.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La angina de pecho crónica estable se debe a la isquemia miocárdica transitoria. La aspirina, nitratos, fármacos bloqueantes de adrenorreceptores beta y fármacos bloqueantes de canales de calcio, solos o en combinaciones entre ellos, son los fármacos usados habitualmente para la angina de pecho.

10

La aspirina como agente antitrombótico, es un tratamiento sintomático para la angina de pecho crónica estable.

Los nitratos se usan para tratar un episodio de angina de pecho y se pueden usar con éxito para la profilaxis en pacientes con síntomas predecibles. Con todos los nitratos, la molesta cefalea puede prevenir su uso en algunos individuos susceptibles.

15

Los fármacos bloqueantes de adrenorreceptores beta, aunque están establecidos como fundamentales en el tratamiento de la angina de pecho, están específicamente contraindicados en pacientes con enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y disfunción ventricular grave, y relativamente contraindicados en diabetes y en aquellos con enfermedad vascular periférica, bradicardia o bloqueo auriculoventricular.

20

Los antagonistas del calcio son ciertamente eficaces en la angina de pecho, logrando sus efectos por relajación de los músculos del estómago en las arterias coronarias y circulación periférica, aumentando el suministro miocárdico y reduciendo el trabajo miocárdico.

25

Aunque hay avances en la terapia de combinación de fármacos en la angina de pecho, en la que la mayoría de los pacientes empiezan la terapia con nitratos y fármacos bloqueantes de adrenorreceptores beta o un antagonista de calcio, es necesario un fármaco para la angina de pecho crónica estable que sea muy eficaz, se pueda tomar durante un periodo muy largo de tiempo y tenga una toxicidad muy baja.

30

En vista de los problemas relacionados con los fármacos mencionados antes, se han hecho notables esfuerzos para aplicar la fitoterapia como una alternativa al tratamiento estándar de la angina de pecho crónica estable. La medicina tradicional china (MTC) ha contribuido mucho a este respecto.

35 Las patentes de EE.UU. nº 5288485 y 5433957 se refieren a un extracto de *hypericum erectum thunb* para curar o prevenir enfermedades causadas por un trastorno en la circulación sanguínea tal como la angina de pecho.

La patente de EE.UU. nº 5776463 se refiere a una composición farmacéutica oral que contiene pétalos de borraja o extracto de pétalos de borraja para prevenir y tratar el estrés que está asociado con cardiopatías circulatorias, incluyendo la angina de pecho.

40

Además del *hypericum erectum thunb* y los pétalos de borraja, también se han usado muchas otras plantas para tratar la angina de pecho. Una de dichas plantas es la *Valeriana officinalis latifolia*. Yang GY y col. (1994) publicaron que se habían tratado 82 pacientes con angina de pecho con *Valeriana officinalis latifolia*, entre los que aparecieron cambios isquémicos del ST-T en el ECG en 50 casos antes del tratamiento. Su tasa de eficacia total para una angina de pecho simple (sin signos isquémicos detectables) era 87,80%; para la angina de pecho con signos isquémicos, 88,00%. Además, se descubrió que la *Valeriana officinalis latifolia* podía disminuir también los lípidos del plasma. No se han encontrado acciones tóxicas en el hígado, riñón y tejido hematopoyético. (1)

45

50 Wu Y. (1990) publicó que en un conjunto de 267 pacientes con angina de pecho, en 93,3% de los pacientes era eficaz el tratamiento con la cápsula *xintongkang*.

Se usó otra preparación herbaria llamada *Shenshao tongguan pian* para tratar la angina de pecho. En 1990, Hu JX. Y col. publicaron que *Shenshao tongguan pian* está compuesto principalmente de saponina del tallo y las hojas de Ginseng y *Radix Paeoniae Alba*, etc. La tasa de eficacia total para el tratamiento de la angina de pecho era 94,71%. Y la tasa de mejora del ECG era 63,38%. Además, el examen de laboratorio puso de manifiesto que *Shenshao tongguan pian* podía promover el gasto ventricular izquierdo, reducir la viscosidad de la sangre e inhibir la agregación de plaquetas de la sangre. Tanto la toxicidad aguda como crónica ensayadas mostraron que *Shenshao tongguan pian* no tenía toxicidad o efectos secundarios.

55

60

El gránulo *Kuo-Guan* es otra preparación herbaria para la angina de pecho. Li Y y col. (1990) publicaron que se midieron cambios en el cinc, cobre y eritrocito glutatión peroxidasa plasmáticos por espectrometría de absorción atómica y desarrollo de color DTNB, en 31 pacientes que padecían una cardiopatía coronaria con angina de pecho antes y después de tomar el gránulo *Kuo-Guan* durante 1 mes. Los resultados indicaban que el cinc y la eritrocito glutatión peroxidasa plasmáticos eran menores y el cobre era mayor en los pacientes que en el grupo de control

65

normal antes del tratamiento ($P < 0,01$), el cinc y la eritrocito glutatión peroxidasa plasmáticos aumentaron y el cobre disminuyó después de tratamiento ($P < 0,01$). Esto sugiere que el mecanismo terapéutico del gránulo *Kuo-Guan* para la cardiopatía coronaria con angina de pecho puede estar relacionado con su regulación de la alteración de los oligoelementos en el cuerpo.

5

La saponina de *Tribulus terrestris* era otra composición herbaria para tratar la angina de pecho.

Fufang Danshen Pian es una prescripción popular del comprimido *Dan Shen* que está indicado para tratar la angina de pecho crónica estable debida a la isquemia arterial coronaria y se ha listado oficialmente en las ediciones de la Farmacopea China desde 1977 y se ha aplicado para uso clínico durante décadas.

10

Fufang Danshen Pian contiene múltiples extractos activos botánicos incluyendo *Danshen* (*Radix Salviae Miltiorrhizae*) y *Sanchi* (*Radix Notoginseng*). Ambos productos botánicos fueron documentados por primera vez en *Shen Nong Ben Cao Jing* (Farmacopea herbaria de Shen-nong) completada en el año 200. *Fufang Danshen Pian* también contiene borneol sintético, una versión del borneol natural (Bingpian). El borneol natural fue documentado por primera vez en *TangBen Cao* (Farmacopea herbaria de la dinastía Tang) compilada alrededor del año 659.

15

Li Cheng-zhu y col. (1979) publicaron en (*Acta Acad. Med. Prim. Shanghai*) un estudio experimental del efecto de la inhibición trombótica de *Radix Salviae Miltiorrhizae*. Se observaron efectos en la trombosis in vitro, funciones de plaquetas y coagulación, fibrinólisis en conejos. Después de inyección de *Radix Salviae Miltiorrhizae*, se encontró que 3 conexiones tenían una función importante en la inhibición de la trombosis in vitro: (1) inhibición de la función de plaquetas; (2) inhibición de la función de coagulación; y (3) promoción de la fibrinólisis. De los cuales, los dos primeros mecanismos funcionan más intensamente. Los resultados se ajustan a los del tratamiento de las enfermedades trombóticas, en especial las enfermedades trombóticas arteriales.

20

Chiang WT y col. (1982) publicaron en (*Acta Acad. Med. Prim. Shanghai*) los efectos de "*Danshensu*" y los otros dos componentes solubles en agua de la *salvia miltiorrhizae* en miocardio isquémico de perro y arteria coronaria de cerdo aislada. Se comparó el efecto de 3 nuevos componentes solubles en agua, es decir *Danshensu* (DS-182, ácido D(+)-3,4-dihidroxifenil-láctico), protocatecualdehído (PCAD) y un ácido diterpénico impuro (DS-187) aislado de *Salvia miltiorrhiza Bunge*, con los del dipiridamol. Los resultados pusieron de manifiesto: (1) en ratones, DS-182 dio una protección significativa frente a la hipoxia, mientras que el PCAD era ineficaz; (2) DS-182 podía anular la elevación isquémica del ST-T electrocardiográfico inducida por pituitrina, pero no tenía influencia en la frecuencia cardiaca reducida. DS-187, PCAD y dipiridamol solo mostraron una protección incompleta; (3) en el modelo de infarto agudo de perro preparado por ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda, los beneficios logrados por inyección intravenosa de DS-182 probaron ser superiores a los de DS-187 y PCAD con respecto a la función ventricular izquierda, presión sistólica máxima ventricular (LVPSP) y presión diastólica final ventricular izquierda (LVEDP). Por el contrario, el PCAD produjo efectos adversos en la LVPSP y LVEDP. El dipiridamol administrado por vía intravenosa, aunque no cambió la LVEDP, suprimió la LVPSP significativamente con efecto hipotensor notable. Todos estos componentes de la *Salvia* y el dipiridamol redujeron significativamente el tamaño del infarto miocárdico final (evaluación N-BT); DS-182 era el más eficaz, el dipiridamol y DS-187 los siguientes, mientras que el PCAD el menos eficaz; (4) en la preparación de arteria coronaria perfundida aislada de cerdo, DS-182 redujo significativamente la resistencia del vaso coronario, mientras que DS-187, PCAD o el sulfonato sódico de *Tanshinone II-A* (DS-201), otro componente de *Salvia*, la aumentó. La acción constrictora de la morfina y el propranolol en la preparación de arteria coronaria aislada era antagonizada por la administración previa de DS-182. Todo esto sugería que *Danshensu* podía ser el principal principio activo de *Salvia miltiorrhiza* en el tratamiento de la enfermedad cardiaca isquémica y que su uso simultáneo con propranolol o morfina sería beneficioso.

35

Li Cheng-zhu y col. (1983) publicaron en (*Chin. J. Integr. Med.*) el efecto anticoagulante de *Radix Salviae Miltiorrhizae*. *Danshensu* es un monómero soluble en agua extraído de *Radix Salviae Miltiorrhizae*. También es el ingrediente principal de la inyección de *Radix Salviae Miltiorrhizae* comercializada. El presente estudio probaba que *Danshensu* inhibe la trombosis in vitro, la agregación plaquetaria (inducida por ADP), y los sistemas de coagulación internos y externos; disminuye el número de plaquetas y promueve la degradación de fibrina o fibrinógeno. Los efectos máximos eran a los 30 min después de una sola inyección de 20 mg/kg en conejos, duraban 1 h, y se recuperaban gradualmente. 4,5 h después de la inyección, todos recuperaron la normalidad, salvo los del ensayo de trombosis in vitro.

50

Chen Zhanghua (1987) publicó en *Acta Acad. Med Prim. Shanghai* los efectos de "*Danshensu*" en alteraciones microcirculatorias experimentales y concentraciones plasmáticas de ácido láctico. El *Danshensu* natural es un monómero soluble en agua extraído de *Radix Salviae Miltiorrhizae* (RSM). Las alteraciones microcirculatorias en conejos fueron inducidas por inyección intravenosa de dextrano de alto peso molecular. El *Danshensu* natural (dosificación de 4-6 mg/kg) aumentaba notablemente el número de vasos capilares en la conjuntiva bulbar, y también disminuía la concentración plasmática de ácido láctico en los conejos. Los trastornos de la microcirculación mesentérica se produjeron mediante goteo de noradrenalina local (4 g) en ratones. El *Danshensu* natural dilatava las arterias y aceleraba la velocidad del flujo sanguíneo, eliminando así la estasis sanguínea de la microcirculación. En los experimentos de los autores de la invención se observaron simultáneamente los efectos de *Danshensu* sintético.

60

65

Los resultados mostraron que no había una diferencia significativa entre *Danshensu* natural y sintético en el alivio de las alteraciones microcirculatorias.

Sun Xi-ming y col. (1991) publicaron una nueva acción farmacológica de un extracto de *Danshen* (*Salvia miltiorrhiza*). El artículo publica que se encontró que un extracto de *Danshen* (*Salvia miltiorrhiza*) que contiene las sales sódicas del ácido D-(+)-(3,4-dihidroxifenil)láctico tenía una nueva acción farmacológica de disminución de la biosíntesis de colesterol en células y antioxidación lipoproteica, por estudios de cultivo celular. Cuando se comparó con el control, su velocidad de migración electroforética era notablemente menor y el contenido de MDA y la citotoxicidad disminuyeron de forma evidente. Estos resultados indicaban que las sales del ácido D-(+)-(3,4-dihidroxifenil)láctico pueden ser eficaces para prevenir y tratar la aterosclerosis.

Zheng Ruo-xuan y col. (1992) publicaron en (*Chin. J. Integr. Med.*) el efecto de preservación de *Radix Salviae Miltiorrhizae* en la isquemia miocárdica inducida por ligación coronaria en ratones. El evidente efecto de preservación en la isquemia miocárdica aguda en ratones por ligación coronaria se podía obtener después de administración i.p. de extracto en agua de *Radix Salviae Miltiorrhizae* (5 g de fármaco bruto/kg). La elevación del segmento S-T en el ECG debido a la isquemia miocárdica en el grupo de tratamiento era mucho menor, el tamaño de la isquemia del ventrículo izquierdo era menor y la tasa de supervivencia era mayor comparado con el control.

Wu Yao-zhong y col. (1995) publicaron en (*Acta Nanjing Univ. Trad. Chin. Mater. Med.*) los efectos de *Radix Salviae Miltiorrhizae* en la promoción de la circulación sanguínea eliminando la estasis sanguínea. La investigación farmacológica de *Radix Salviae Miltiorrhizae* es común. Sin embargo, son raros los estudios reológicos de *Radix Salviae Miltiorrhizae* evaluando PGI₂, ET y TXA₂ producidos por plaquetas. Se evalúan en el presente estudio la influencia de *Radix Salviae Miltiorrhizae* en la trombosis, los cambios de PT, KPTT, FG, ESR y HCT, y la agregación de plaquetas en conejos. Las conclusiones son que *Radix Salviae Miltiorrhizae* reduce la síntesis de TXA₂ y disminuye los efectos de potenciación de la agregación plaquetaria y la trombosis.

Shi Lin y col. (1990) publicaron en (*Acta Pharmacol. Sin.*) los efectos de las saponinas totales de *Panax Notoginseng* en el aumento de la PGI₂ en la arteria carótida y disminución de TXA₂ en las plaquetas de la sangre. Las saponinas totales de *Panax notoginseng* (PNS) se administraron por vía oral 100 mg/(kg-día) a conejos durante 8 semanas. La formación de placa aterosclerótica aórtica se limitó comparada con la del grupo de control. Se usó el radioinmunoensayo para investigar los efectos de PNS en los contenidos de prostaciclina en la arteria carótida y del tromboxano A₂ en las plaquetas de la sangre de conejos. La administración oral de PNS 25, 50, 100 mg/(kg-día) durante 10 días produjo un aumento de prostaciclina en la arteria carótida y una disminución de tromboxano A₂ en las plaquetas de la sangre comparado con el grupo de control. Estos resultados mostraron que la acción antiaterosclerótica de la PNS puede ser un resultado de la corrección del desequilibrio entre prostaciclina y tromboxano A₂.

Li Xing y col. (1990) publicaron en (*Acta Pharmacol. Sin.*) los efectos protectores de las saponinas de *Panax Notoginseng* en la lesión miocárdica experimental inducida por isquemia y reperfusión en ratas. Se estudiaron los efectos de las saponinas totales de *Panax Notoginseng* (PNS) y ginsenoides purificados R_{b1} y R_{g1} de PNS en la lesión miocárdica inducida por isquemia cardiaca y reperfusión, usando corazones de rata in situ e in vitro. En ratas anestesiadas con pentobarbital, el tratamiento previo con PNS (100 y 200 mg/kg) proporcionó una reducción significativa del tamaño de infarto miocárdico después de ligación de la arteria coronaria descendente izquierda (40 min) y reperfusión (120 min) comparado con el control. PNS 12,5 y 25 mg/l, R_{b1} 10 mg/l y R_{g1} 10 mg/l disminuyeron significativamente la liberación cardiaca de CPK, atenuaron la acumulación miocárdica de Ca⁺⁺, redujeron la producción de malondialdehído (MDA) y previnieron la reducción de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), en comparación con el control en corazones de rata aislados perfundidos, con isquemia global (40 min) y reperfusión (15 min). Los resultados mostraron que PNS, R_{b1} y R_{g1} prevenían la isquemia cardiaca y se consideró que la acción estaba relacionada con la inhibición de la peroxidación lipídica.

Huang Cong y col. (1991) publicaron en (*Chin. Bull. Pharmacol.*) los efectos de las saponinas de *Panax Notoginseng* en la lesión por isquemia y reperfusión miocárdica en conejos conscientes. Se estudiaron los efectos de las saponinas de *Panax Notoginseng* (PNGS) en la lesión por isquemia y reperfusión miocárdica en conejos conscientes, observando los cambios en el electrocardiograma (ECG), las actividades de la creatina fosfoquinasa (CPK) y lactato deshidrogenasa (LD) en el tamaño de la zona isquémica. Las PNGS con una dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg redujeron significativamente el tamaño de la zona de la isquemia miocárdica. Estos resultados sugerían que las PNGS tienen efectos protectores en la lesión pos isquemia y reperfusión miocárdica.

Mo Qi-xian y col. (1987) publicaron en (*Propriet. Trad. Chin. Med. Res.*) la dinámica del ³H-borneol. Con el fin de destacar el mecanismo de inducción de la reanimación de la aromaticidad del borneol, se llevaron a cabo los estudios dinámicos del ³H-borneol por inyección intravenosa y administración oral. Los resultados pusieron de manifiesto que el tiempo de semivida era 2,8 min después de una sola inyección intravenosa de ³H-borneol. Esto sugería que el fármaco se distribuía rápidamente a los órganos y tejidos relevantes después de la administración y producía un efecto rápido. La distribución in vivo se concentraba en órganos y tejidos que tienen abundante flujo sanguíneo, tales como el corazón, pulmón, hígado, riñón y cerebro, etc. Esto proporcionaba cierta base teórica a la

aplicación clínica. Puesto que la semivida decreciente era 5,3 h después de la administración oral del fármaco, esto sugería que el borneol oral no podía conducir a la acumulación, sino que tenía una biodisponibilidad baja. Deben llevarse a cabo más estudios para discutir la relación con la dosis de fármaco y la forma farmacéutica.

- 5 Chen Tie-feng y col. (1990) publicaron en (*Acta Pharmacol. Sin.*) la potenciación de la absorción de la tetrametilpirazina por el borneol sintético. Se administró por vía ig a ratas Sprague-Dawley fosfato de tetrametilpirazina (TMP) 5 mg/kg con o sin borneol 5 mg/kg previo. Las concentraciones plasmáticas de TMP se analizaron por el procedimiento de GC y los datos se trataron mediante el programa NONLIN. Las $C_{m\acute{a}x}$ eran 931 y 562 ng/ml, respectivamente, ($p < 0,01$); mientras que las AUC eran 68849 y 37174, respectivamente, ($P < 0,05$). Se sugiere que el borneol potencia la absorción del TMP pero no la eliminación.

- 15 Xu Wei y col. (1995) publicaron en (*Pharmacol. Chin. Med. Clin.*) el efecto del mentol y borneol en la distribución de la sulfadiazina de sodio y el azul de Evans en el cerebro de rata y ratón. El mentol (1,5 g/kg, ig) y el borneol (1,5 g/kg) prolongaron la semivida $t_{1/2}$ de la distribución de la sulfadiazina de sodio en ratas. La dosificación anterior de mentol y borneol administrado por vía oral, también aumentó la concentración de sulfadiazina de sodio en el cerebro de la rata. El mentol (ig 0,5 g/kg durante 3 días) y el borneol (ig 0,5 g/kg durante 3 días) promovieron la concentración de azul de Evans en el cerebro de ratón, pero el valor de la concentración era significativamente menor que el de los ratones que padecían la lesión por isquemia-reperusión. Los resultados sugerían que el mentol y el borneol podían potenciar la transferencia de sulfadiazina de sodio en la barrera hematoencefálica sin dañar la barrera hematoencefálica.

En Estados Unidos, la cardiopatía aterosclerótica coronaria es la causa más común de incapacidad cardiovascular y muerte.

- 25 La aterosclerosis es un trastorno arterial caracterizado por el amarilleamiento de placas de colesterol, lípidos y residuos celulares en las capas internas de las paredes de arterias de tamaño grande y medio. La afección empieza con una estría grasa y se acumula gradualmente hasta una placa fibrosa o lesión ateromatosa. Las paredes de los vasos sanguíneos se vuelven gruesas, fibróticas y calcificadas. El lumen arterial se estrecha.

- 30 Muchas placas ateroscleróticas permanecen estables o evolucionan gradualmente. Otras pueden romperse produciendo hemorragia, activación de plaquetas y por lo tanto trombosis intravascular. La trombosis coronaria produce la oclusión de los vasos parcial o completa, dificulta el flujo sanguíneo, y conduce así a la angina de pecho inestable o infarto de miocardio. Alternativamente, las placas rotas pueden reestabilizarse, produciendo a menudo estenosis más grave.

- 35 El ejercicio y el estrés mental aumentan la demanda miocárdica de oxígeno. En condiciones fisiológicas normales, la mayor demanda miocárdica de oxígeno la satisfacen las arteriolas que se dilatan aumentando así el flujo sanguíneo. En presencia de aterosclerosis, las arteriolas pueden dilatarse en grado máximo para satisfacer la demanda básica. Dichas arteriolas dilatadas pueden ser incapaces de satisfacer la mayor demanda miocárdica de oxígeno. Cuando la demanda de oxígeno supera el suministro de oxígeno, se produce la isquemia miocárdica. Alternativamente, las oclusiones graves de vasos pueden limitar el flujo sanguíneo y esto produce la isquemia miocárdica. La manifestación clínica de la isquemia miocárdica transitoria es la angina de pecho que es un dolor torácico paroxístico, con frecuencia extendido a los brazos, en particular al brazo izquierdo, acompañado o no de una sensación de asfixia y muerte inminentes.

- 45 La angina de pecho se subdivide en dos: estable e inestable. La angina de pecho estable es producida por la mayor demanda miocárdica de oxígeno en la mayoría de los casos. Por lo tanto, la angina de pecho estable ataca con una frecuencia y duración predecibles tras provocación con aumentos de los requisitos miocárdicos de oxígeno, tales como ejercicio, estrés mental, etc. En cambio, la angina de pecho inestable ataca sin provocación y normalmente causada por el menor suministro de oxígeno al miocardio. La alteración de la placa, taponamiento plaquetario, y trombosis coronaria, disminuyen el suministro de oxígeno al miocardio.

- 55 La angina de pecho se trata con diferentes fármacos, procedimientos quirúrgicos, revascularización coronaria, angioplastia con balón, colocación de endoprótesis, etc. La terapia para la angina de pecho estable es principalmente minimizar la demanda miocárdica de oxígeno así como una medida preventiva. La terapia para el síndrome agudo de la angina de pecho inestable es principalmente inhibir la activación de plaquetas y trombolisis.

- 60 Los agentes terapéuticos actuales para la angina de pecho crónica estable son la nitroglicerina, otros nitratos, bloqueantes de canales de calcio y bloqueantes de adrenorreceptores beta. Estos fármacos administrados solos o combinados con otros fármacos, alivian o previenen más que curar la angina de pecho.

- 65 Cuando se produce la crisis anginosa, se administra nitroglicerina por vía sublingual para aliviar los síntomas. La nitroglicerina también se aplica para prevenir las crisis anginosas producidas por esfuerzo y estrés. Los nitratos se aplican para prevenir las crisis anginosas. La nitroglicerina y los nitratos median su efecto principalmente relajando el músculo liso vascular, reduciendo la actividad miocárdica, y por lo tanto reduciendo la demanda miocárdica de

oxígeno. Los efectos secundarios son cefalea pulsátil, mareo, debilidad, hipotensión ortostática, taquicardia, etc.

Los bloqueantes de adrenerreceptores beta tales como el propranolol se aplican para prevenir la angina de pecho reduciendo los requisitos miocárdicos de oxígeno durante el esfuerzo y estrés. Las principales contraindicaciones son la enfermedad broncoespástica, bradiarritmias e insuficiencia cardíaca sintomática. En los individuos con asma y otras formas de obstrucción de las vías aéreas, los bloqueantes beta pueden empeorar su afección.

Los antagonistas de calcio se aplican para prevenir la angina de pecho reduciendo la demanda de oxígeno del miocardio. El miocardio depende del influjo de calcio para las funciones normales. Al inhibir el influjo de calcio, los antagonistas de calcio pueden relajar el músculo liso del vaso sanguíneo, disminuir la actividad miocárdica, reducir la demanda de oxígeno del miocardio, y así prevenir la angina de pecho. Los antagonistas de calcio tienen efectos secundarios adversos. Los efectos secundarios suaves son sofoco, edema, mareo, náuseas, etc. La inhibición excesiva del influjo de calcio al miocardio puede producir efectos secundarios graves tales como el paro cardíaco, bradicardia, bloqueo auriculoventricular, insuficiencia cardíaca congestiva, etc. Combinados con los fármacos beta adrenérgicos, a menudo los efectos secundarios de los antagonistas del calcio aumentan.

En China, se han usado *Panax Notoginseng* y *Radix Salviae Miltiorrhizae* para tratar la enfermedad cardiovascular desde el año 200 AD (Farmacopea herbaria de Shen-nong). *Panax Notoginseng* se ha usado para tratar la angina de pecho. *Radix Salviae Miltiorrhizae* se ha usado para promover la circulación sanguínea y dispersar la estasis sanguínea. Numerosos estudios preclínicos y clínicos demuestran la eficacia y la seguridad de *Panax Notoginseng* y *Radix Salviae Miltiorrhizae*.

La medicina tradicional china es la mezcla de varias plantas que requieren decocción. Una forma modificada de la medicina china para tratar la cardiopatía coronaria es el comprimido Dan Shen. El comprimido Dan Shen es una bola grande untuosa, a menudo tan grande como de 1 cm de diámetro. Los comprimidos Dan Shen están compuestos del extracto de *Radix Salviae Miltiorrhizae*, polvo de *Panax Notoginseng* y borneol sintético, y están listados en la Farmacopea China desde 1977, y se han usado para tratar la cardiopatía durante décadas.

La píldora Danshen (DSP) descrita o llamada píldora cardiotónica es una nueva generación de medicina china para cardiopatías coronarias. La medicina china consiste en diferentes plantas medicinales que varían de una prescripción a otra con respecto al tipo de plantas medicinales, así como en la proporción de las plantas medicinales. Para controlar la calidad, la DSP se fabrica con la fórmula normalizada. Los componentes terapéuticos de la DSP son extractos solubles en agua de *Radix Salviae Miltiorrhizae* al 10-30% y a veces aproximadamente 20%, los extractos solubles en agua de *Panax Notoginseng* (2-6%) y borneol (1-3%). Además, para aliviar la angina de pecho rápidamente, la DSP se ha fabricado como una píldora pequeña que se puede disolver inmediatamente por administración sublingual, administrar al miocardio rápidamente y por lo tanto aliviar rápido la angina de pecho.

Se ha probado que la DSP no es tóxica y es eficaz para prevenir y tratar la enfermedad cardiovascular producida por isquemia arterial coronaria en estudios preclínicos y clínicos. Además, la eficacia superior de la DSP frente a los comprimidos Dan Shen para tratar la enfermedad arterial coronaria se ha demostrado en estudios preclínicos y clínicos.

La DSP está listada en la edición del suplemento de la Farmacopea China desde 1998, ha sido aprobada por el Ministerio de Salud Chino, comercializada como fármaco en China desde 1993, y la usan más de cinco millones de personas.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La píldora Dan Shen (DSP) descrita es una nueva generación de medicina china para tratar la cardiopatía coronaria, fabricada con la fórmula normalizada. La DSP comprende la cantidad normalizada de extractos de *Panax Notoginseng*, extractos de *Radix Salviae Miltiorrhizae*, y borneol.

Panax Notoginseng está incluido para aliviar y prevenir la angina de pecho. *Radix Salviae Miltiorrhizae* está incluido para inhibir la activación de plaquetas, prevenir la trombosis coronaria y por lo tanto promover la circulación sanguínea. El borneol está incluido para suministrar eficazmente los componentes terapéuticos al miocardio.

La DSP se fabrica como una píldora pequeña, de aproximadamente 25 mg, que se puede disolver inmediatamente tras la administración sublingual y por lo tanto puede mediar sus efectos terapéuticos rápidamente. La eficacia de la DSP para aliviar y prevenir la angina de pecho se ha probado en estudios preclínicos y clínicos.

La presente invención describe un procedimiento para preparar una píldora Dan Shen (DSP) para usar para tratar la angina de pecho crónica estable, y una píldora DS que se puede obtener por este procedimiento como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

65

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

Figura 1: Lote nº: 19990806

Figura 2. Lote nº: 19990815

5 Figura 3. Lote nº: 19990823

Posición de los picos de la huella dactilar: Grupo I que consiste en los picos 1 y 2 (tiempo de retención en el intervalo de 7 a 15 min); Grupo II que consiste en los picos 3 y 4 (tiempo de retención en el intervalo de 15 a 20 min); Grupo III que consiste en los picos 5, 6, 7 y 8 (tiempo de retención en el intervalo de 20 a 40 min). Visto en conjunto, la
10 abundancia de picos en el grupo I es la mayor, y la altura del pico 1 es cercana a la del pico 2. Los picos del grupo II están lado a lado, tienen casi la misma altura y la abundancia es muy pequeña. El grupo III está compuesto de 4 picos, y su altura aumenta gradualmente. Estos tres grupos componen la huella dactilar representativa del compuesto de las píldoras Danshen Dripping.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a una composición del medicamento píldora Dan Shen (DSP) que comprende:

(a) extractos (solubles en agua) de *Radix Salviae Miltorrhizae*, extractos (solubles en agua) de *Panax Notoginseng*
20 y borneol (sintético);

(b) *Radix Salviae Miltorrhizae*, *Notoginseng*, borneol y vehículos; y

(c) *Radix Salviae Miltorrhizae*, *Panax Notoginseng*, borneol y vehículos farmacéuticos.
25

En una realización del medicamento anterior, la *Radix Salviae Miltorrhizae* y *Panax Notoginseng* se usan como se usan en China para tratar la cardiopatía coronaria desde el año 200 AD. *Panax Notoginseng* se ha usado para tratar la angina de pecho y *Radix Salviae Miltorrhizae* se ha usado para promover la circulación sanguínea. El borneol se usa para facilitar el suministro rápido de los componentes terapéuticos a los órganos diana. El borneol natural se ha
30 usado en China desde el año 600 AD. Puesto que el borneol está casi extinguido, la DSP comprende borneol sintético.

Esta invención proporciona el uso de la DSP para:

35 (a) tratamiento de la cardiopatía coronaria;

(b) tratamiento de la cardiopatía coronaria junto con otros fármacos;

(c) prevención primaria de la cardiopatía coronaria;
40

(d) prevención primaria de la cardiopatía coronaria junto con otros fármacos;

(e) prevención secundaria de la cardiopatía coronaria;

45 (f) prevención secundaria de la cardiopatía coronaria junto con otros fármacos; y

(g) reducción de ingestión de nitratos por los pacientes con angina de pecho; y

(h) reducción del nivel de colesterol en el suero.
50

En una realización de la DSP, la indicación es para la arterosclerosis coronaria tal como, peso sin limitar, para aliviar la angina de pecho, para prevenir la angina de pecho causada por esfuerzo y estrés, y para promover la circulación sanguínea por inhibición de la agregación plaquetaria para prevenir así la formación de trombo coronario. La DSP se puede aplicar para reducir la ingestión de nitroglicerina que se usa con frecuencia para aliviar y prevenir la angina de
55 pecho. La DSP también se puede aplicar para reducir el nivel de colesterol en el plasma, para así prevenir la formación de nuevas lesiones ateroscleróticas. La arterosclerosis se inicia con frecuencia por estrías de colesterol depositadas en las paredes de los vasos.

En otra realización, la DSP comprende 5-40% de ácido fenólico soluble en agua de *Radix Salviae Miltorrhizae*, 1-
60 10% de saponina de *Panax Notoginseng* soluble en agua, y 1-5% de borneol.

En otra realización, la DSP comprende 10-30% de ácido fenólico soluble en agua de *Radix Salviae Miltorrhizae*, 2-
6% de saponina de *Panax Notoginseng* soluble en agua y 1-3% de borneol.

65 En otra realización, el tamaño de las píldoras pequeñas es:

- (a) 0,33-0,34 cm de diámetro;
- (b) 21,25-28,75 mg de peso; y
- 5 (c) 1,13-1,40 mg/mm³ de densidad.

DETALLES EXPERIMENTALES

10 Fabricación de la píldora Dan Shen (DSP)

La DSP es una píldora pequeña, de aproximadamente 25 mg, cuyos componentes terapéuticos comprenden extractos solubles en agua de *Notoginseng*, extractos solubles en agua de *Salviae* y borneol sintético.

- 15 Para la fabricación de la DSP, se extraen el *Notoginseng* y la *Salviae* por separado con agua caliente en sistemas de circulación y se filtran. Los filtrados se condensan en condiciones de descompresión, se filtran y precipitan. Los concentrados se refinan usando columnas de resina y se concentran en condiciones de descompresión. Los extractos solubles en agua refinados así obtenidos se mezclan con borneol sintético y vehículos farmacéuticos. La mezcla se conforma en una píldora pequeña usando una máquina de vertido especial. La calidad de la DSP se
- 20 controla mediante normalización de la cantidad así como de la proporción de sus componentes terapéuticos principales, saponina, ácido fenólico tal como Sanshensu y borneol. Se usan la cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alto rendimiento, la huella dactilar y otras técnicas analíticas para identificar y cuantificar los componentes terapéuticos en la DSP.

25 Fabricación de la DSP

1. Extracción de los componentes solubles en agua de *Panax Notoginseng*

- (a) Dilución de las plantas medicinales con 5-7 veces de agua.
- 30 (b) Extracción de los componentes solubles en agua de *Panax Notoginseng* mediante ebullición en un tanque con una presión de aire entre 0,04-0,06 mPa durante 2 h.
- (c) Repetición de la extracción en las mismas condiciones durante 1,5 h.
- 35 (d) Filtración de la extracción con una malla nº 100.
- (e) Refinado del filtrado usando resina de adsorción macroporosa eluyendo con etanol.
- 40 (g) Concentración de los extractos eluidos en condiciones de descompresión con una entrada de aire de 0,04-0,06 mPa y vacío de -0,076 ~-0,088 mPa hasta que la densidad es 1,33-1,35.

2. Extracción de los componentes solubles en agua de *Radix Salviae Miltorrhizae*

- 45 (a) Dilución de las plantas medicinales con 5-7 veces de agua.
- (b) Extracción de los componentes solubles en agua de *Radix Salviae Miltorrhizae* mediante ebullición en un tanque con una presión de aire entre 0,04-0,06 mPa durante 2 h.
- 50 (c) Repetición de la extracción en las mismas condiciones durante 1,5 h.
- (d) Filtración de la extracción con una malla nº 100.
- (e) Concentración de los filtrados en condiciones de descompresión con una presión de vacío de -0,076 ~-0,088
- 55 mPa hasta que 1 kg de plantas medicinales inicial se convierta en 1 litro.
- (f) Precipitación de los concentrados con etanol.
- (g) Filtración de la disolución de los precipitados en etanol a través de una malla nº 100
- 60 (h) Concentración de los filtrados en condiciones de descompresión con una presión de entrada de aire de 0,04-0,06 mPa y presión de vacío de -0,076 ~-0,088 mPa.
- (i) Refinado de los concentrados por cromatografía en poliamida eluyendo con etanol.
- 65

(j) Concentrado de los extractos refinados hasta la densidad de 1,33-1,35.

3. Producción de DSP

5 (a) Mezcla de los extractos de *Panax Notoginseng*, los extractos de *Radix Salviae Miltorrhizae*, el borneol sintético y el polietilenglicol 6000 en una relación de 4,0:20,6:1,9:79,5.

(b) Fusión de la mezcla.

10 (c) Formación de la mezcla fundida en DSP usando la máquina de vertido con las siguientes características: la temperatura del recipiente de vertido es de forma constante 89-93°C, la disolución de enfriamiento es parafina líquida cuya temperatura es inferior a 8°C, el diámetro interior de la cabeza de vertido es 1,8 mm, el diámetro exterior de la cabeza de vertido es 2,4 mm, la distancia entre la cabeza de vertido y la superficie de la disolución de enfriamiento es 15 cm.

15

(d) Centrifugación de las píldoras a 800-1100 rpm durante 15 min para separar los aceites.

Control de calidad de la DSP

20 La DSP contiene los componentes terapéuticos identificados, aldehído protocatéquico y saponina, así como otros componentes diferentes. El contenido de estos compuestos en las plantas medicinales varía de un lote a otro de plantas. Para normalizar el contenido de los componentes terapéuticos en la DSP y por lo tanto controlar la calidad de la DSP, se ha desarrollado un procedimiento para identificar y cuantificar agentes terapéuticos en medicamentos. Un ejemplo de los procedimientos comprende:

25

(a) Disolver 30 DSP en 3 ml de metanol y tratar con ultrasonidos durante 10 min.

(b) Centrifugar durante 5 min.

30 (c) Fraccionar el líquido sobrenadante usando técnicas analíticas estándar usando cromatografía en capa fina, cromatografía de líquidos de alto rendimiento, etc.

(d) Identificar los componentes terapéuticos de la DSP tales como *Danshensu* de sodio, aldehído protocatéquico, saponina, etc. comparando las fracciones de la DSP con las referencias purificadas relevantes en relación con la posición, tamaño y color.

35

(e) Identificar y cuantificar los componentes terapéuticos de la DSP comparando la posición, tamaño y color de las fracciones de la DSP con la posición, color y tamaño de las referencias purificadas relevantes.

40 (f) Identificar los componentes terapéuticos de la DSP comparando el tiempo de retención relativo y el área relativa de los picos en las zonas de huella dactilar con el tiempo de retención relativo y el área de los picos en las zonas de huella dactilar de referencia.

Identificación por TLC de la DSP

45

Un procedimiento para identificar el *Danshensu* de sodio y aldehído protocatéquico de una composición herbaria capaz de tratar la angina de pecho crónica estable por cromatografía en capa fina, comprende las etapas de:

a) Preparar el ensayo que comprende las etapas de:

50

i. Poner 30 pellets de dicha composición en 3 ml de metanol y disolver mediante ultrasonidos durante 10 min para formar una disolución;

ii. Centrifugar la disolución durante 5 min y recoger el líquido sobrenadante;

55

iii. Poner en contacto 10 µl de la disolución sobre una placa de gel de silico G que contiene CMC-Na al 0,5%;

iv. Desarrollar la placa con una disolución de desarrollo que consiste en cloroformo, acetona y ácido metanoico en una relación 10:4:1,6;

60

v. Secar y pulverizar la placa con amoníaco y dejar la placa hacia arriba durante 15 min;

vi. Comprobar la placa bajo la luz ultravioleta, la mancha que representa dicha composición debe estar en la correspondiente posición de las referencias y mostrar el mismo color.

65

b) Usar *Danshensu* de sodio y aldehído protocatéquico como referencias.

Un procedimiento para identificar gipenósido de una composición herbaria capaz de tratar la angina de pecho crónica estable por cromatografía en capa fina, que comprende las etapas de:

5

a) Preparar el ensayo que comprende las etapas de:

i. Poner 30 pellets de dicha composición en 5 ml de disolvente amoniaco y disolver mediante ultrasonidos para formar una disolución;

10

ii. Poner dicha disolución en la columna de resina de adsorción macroporosa; la velocidad es 0,5/min;

iii. Después de lavar la columna de resina de adsorción macroporosa con 20 ml de agua destilada, la columna de resina de adsorción macroporosa se eluye con 2 ml de disolución de metanol;

15

iv. Recoger el eluyente;

v. Poner en contacto 10 µl de dicho eluyente sobre una placa de gel de silicio G que contiene CMC-Na al 0,5%;

20 vi. Desarrollar la placa con 10 ml de disolución de desarrollo que es la capa inferior clarificante de la disolución de cloroformo, acetona y agua en una relación 6:3:1 después de 2 h a 10°C;

vii. Después de secar y pulverizar con sulfato de etanol al 10%, la placa se calienta en horno a 105°C durante varios minutos;

25

viii. Comprobar la placa con luz normal, la mancha que representa dicha composición debe estar en la correspondiente posición de las referencias y mostrar el mismo color.

b) Usar gipenósido total, Saponina R1 y gipenósido Rg1 como referencias.

30

Huellas dactilares de la píldora cardiotónica

1. Preparación de las zonas de huella dactilar

35 (1) Sistema cromatográfico e idoneidad del sistema

Se usó silico-18 conectado por alquilsilano como fase estacionaria, y la mezcla de A y B como fase móvil. A era metanol y B era la mezcla de agua-N,N-dimetilformamida-ácido acético glacial (100:45:4). La concentración de A cambia de 5% a 30% cuando transcurre un tiempo de elución con gradiente de 0 a 25 min. La longitud de onda de detección se fijó en 281 nm. El número de platos teóricos de la columna no era inferior a 2000 cuando se calculó con el pico del *Danshensu*.

40

(2) Aparato y reactivos

45 Cromatógrafo: Cromatógrafo de líquidos HP 1100
 Detector: detector de ultravioleta HP tipo VWD
 Columna: columna ODS 5 µ, 250 x 4,6 mm, Alltech Company
 Pre-columna: pre-columna Alltima C₁₈ 5µ, Alltech Company
 Temperatura de la columna: 30°C

50

(3) Preparación de la muestra de control

Se disuelven ácido salviánico B, *Danshensu* y aldehído protocatéquico respectivamente en metanol para producir tres disoluciones de control, que cada ml contenía 50 µg, 40 µg y 10 µg, de forma correspondiente.

55

(4) Preparación de la muestra de ensayo

Se ponen 10 píldoras de la píldora cardiotónica en un matraz aforado de 25 ml, se añaden 20 ml de metanol, se trata con ultrasonidos durante 20 min, se deja enfriar, se diluye la disolución hasta la marca de graduación con metanol, se centrifuga y se coge el líquido sobrenadante como la disolución de ensayo.

60

(5) Procedimiento

Se inyectan con precisión 10 µl de cada una de las disoluciones de control y la disolución de ensayo, respectivamente, en la columna, se registra el cromatograma y se calcula el contenido.

65

2. Huellas dactilares de los diferentes lotes de la píldora cardiotónica

Se ensayaron 20 lotes de muestras de píldora cardiotónica con el procedimiento descrito antes, y los datos estadísticos se muestran en la tabla 1, tabla 2 y tabla 3. Estos datos pusieron de manifiesto que la píldora cardiotónica tenía su propia huella dactilar específica y las huellas dactilares contenían 8 picos comunes, es decir, estos picos existían simultáneamente en todos los lotes de DSP. Considerando el pico del aldehído protocatéquico como el pico de referencia, cuyo tiempo de retención relativo era 1, el valor medio del tiempo de retención relativo de los 8 picos era 0,672, 1,000, 1,417, 1,512, 2,016, 2,235, 2,407, 2,757. Los valores del tiempo de retención relativo y el área relativa de los 8 picos eran muy estables, y entre los 8 picos comunes, el pico nº 1 era el Danshensu, el pico nº 2 el aldehído protocatéquico y el pico nº 7 el ácido salviánico B, y la relación de los valores de las áreas relativas era 0,476-0,668: 1: 0,391-0,641, respectivamente.

Las huellas dactilares de los 3 lotes de la píldora cardiotónica también se proporcionan en las figuras 1 a 3.

15

Tabla 1. Tiempo de retención y tiempo de retención relativo de los picos de 20 lotes de DSP

Lote n°	Pico n°1		Pico n°2		Pico n°3		Pico n°4		Pico n°5		Pico n°6		Pico n°7		Pico n°8	
	tiempo de retención relativo	tiempo de retención	tiempo de retención relativo	tiempo de retención	tiempo de retención relativo	tiempo de retención	tiempo de retención relativo	tiempo de retención	tiempo de retención relativo	tiempo de retención	tiempo de retención relativo	tiempo de retención	tiempo de retención relativo	tiempo de retención	tiempo de retención relativo	tiempo de retención
19990806	8,347	0,676	12,341	1,000	17,662	1,431	18,802	1,524	25,090	2,033	27,806	2,253	30,047	2,435	34,146	2,767
19990815	8,313	0,676	12,305	1,000	17,631	1,433	18,769	1,525	25,072	2,038	27,793	2,259	30,046	2,442	34,092	2,771
19990823	8,285	0,672	12,338	1,000	17,498	1,418	18,673	1,513	25,034	2,029	27,742	2,249	29,897	2,423	34,186	2,771
19990921	8,302	0,672	12,350	1,000	17,553	1,421	18,739	1,517	25,005	2,025	27,715	2,244	29,875	2,419	34,155	2,766
19990928	8,299	0,672	12,352	1,000	17,549	1,421	18,727	1,516	24,968	2,021	27,661	2,239	29,804	2,413	34,070	2,758
19991014	8,290	0,672	12,344	1,000	17,496	1,417	18,677	1,513	24,903	2,017	27,604	2,236	29,743	2,410	34,019	2,756
19991026	8,295	0,672	12,337	1,000	17,513	1,420	18,673	1,514	24,889	2,017	27,600	2,237	29,747	2,411	34,017	2,757
19991109	8,286	0,672	12,329	1,000	17,477	1,418	18,642	1,512	24,852	2,016	27,571	2,236	29,722	2,411	34,014	2,759
19991127	8,291	0,672	12,341	1,000	17,502	1,418	18,660	1,512	24,882	2,016	27,594	2,236	29,737	2,410	34,026	2,757
19991205	8,291	0,672	12,340	1,000	17,500	1,418	18,659	1,512	24,862	2,015	27,569	2,234	29,708	2,407	34,007	2,756
20000106	8,287	0,672	12,338	1,000	17,503	1,419	18,664	1,513	24,867	2,015	27,576	2,235	29,721	2,409	34,026	2,758
20000216	8,294	0,671	12,352	1,000	17,536	1,420	18,687	1,513	24,887	2,015	27,590	2,234	29,730	2,407	34,066	2,758
20000323	8,256	0,670	12,329	1,000	17,402	1,411	18,606	1,509	24,869	2,017	27,561	2,235	29,644	2,404	34,067	2,763
20000406	8,272	0,670	12,349	1,000	17,428	1,411	18,628	1,508	24,843	2,012	27,534	2,230	29,613	2,398	34,012	2,754
20000422	8,274	0,670	12,348	1,000	17,425	1,411	18,609	1,507	24,799	2,008	27,493	2,227	29,572	2,395	33,975	2,751
20000513	8,276	0,670	12,350	1,000	17,439	1,412	18,611	1,507	24,791	2,007	27,479	2,225	29,553	2,393	33,944	2,749
20000606	8,273	0,670	12,347	1,000	17,421	1,411	18,597	1,506	24,755	2,005	27,451	2,223	29,524	2,391	33,918	2,747
20000726	8,283	0,670	12,356	1,000	17,413	1,409	18,598	1,505	24,744	2,003	27,440	2,221	29,513	2,389	33,925	2,746
20000728	8,287	0,670	12,368	1,000	17,487	1,414	18,653	1,508	24,807	2,006	27,500	2,223	29,573	2,391	34,001	2,749
20000804	8,274	0,670	12,351	1,000	17,434	1,412	18,597	1,506	24,746	2,004	27,441	2,222	29,515	2,390	33,941	2,748
Valor medio	8,289	0,672	12,343	1,000	17,493	1,417	18,564	1,512	24,883	2,016	27,586	2,235	29,714	2,407	34,030	2,757
± RSD	0,225	0,266	0,104	0,000	0,398	0,447	0,313	0,362	0,416	0,476	0,399	0,463	0,540	0,606	0,219	0,273

Tabla 2. Valor del área del pico y relación de áreas de 20 lotes de DSP

Lote n°	Pico n° 1		Pico n° 2		Pico n° 3		Pico n° 4		Pico n° 5		Pico n° 6		Pico n° 7		Pico n° 8	
	Área	Relación de áreas	Área	Relación de áreas	Área	Relación de áreas	Área	Relación de áreas	Área	Relación de áreas	Área	Relación de áreas	Área	Relación de áreas	Área	Relación de áreas
19990806	1044,800	0,668	1563,800	1,000	269,790	0,173	240,540	0,154	266,040	0,170	583,830	0,373	1001,800	0,641	1568,000	1,003
19990815	834,300	0,576	1448,900	1,000	359,860	0,248	347,080	0,240	340,390	0,235	348,490	0,241	600,210	0,414	994,740	0,687
19990823	1036,100	0,576	1800,300	1,000	409,060	0,227	334,160	0,186	486,430	0,270	495,600	0,275	823,430	0,457	1632,800	0,907
19990921	980,840	0,568	1726,000	1,000	379,050	0,220	317,920	0,184	498,570	0,289	479,530	0,278	875,440	0,507	1518,700	0,880
19990928	1068,000	0,549	1943,800	1,000	397,230	0,204	329,450	0,169	514,290	0,265	595,650	0,306	1092,700	0,562	1828,100	0,940
19991014	984,660	0,589	1670,700	1,000	353,250	0,211	297,610	0,178	504,860	0,302	504,900	0,302	879,420	0,526	1378,000	0,825
19991026	978,100	0,556	1758,900	1,000	348,520	0,198	282,550	0,161	451,380	0,257	416,600	0,237	800,660	0,455	1303,700	0,741
19991109	974,320	0,603	1617,100	1,000	334,350	0,207	275,060	0,170	477,390	0,295	491,810	0,304	836,830	0,517	1302,800	0,806
19991127	1053,800	0,565	1865,300	1,000	413,960	0,222	327,640	0,176	499,750	0,268	521,160	0,279	1047,200	0,561	1643,800	0,881
19991205	1089,600	0,564	1931,200	1,000	391,970	0,203	334,240	0,173	468,210	0,242	521,600	0,270	890,080	0,461	1659,100	0,859
20000106	1130,800	0,571	1979,800	1,000	408,490	0,206	347,890	0,176	512,040	0,259	519,150	0,262	891,890	0,450	1747,000	0,882
20000216	1114,900	0,548	2034,600	1,000	419,800	0,206	426,030	0,209	570,720	0,281	521,100	0,256	1232,200	0,606	1767,500	0,869
20000323	1080,000	0,599	1801,900	1,000	323,240	0,179	294,760	0,164	562,520	0,312	602,060	0,334	1041,600	0,578	1544,700	0,857
20000406	1132,600	0,583	1943,200	1,000	431,080	0,222	374,840	0,193	609,180	0,313	655,030	0,337	1166,600	0,600	1642,400	0,845
20000422	1124,400	0,508	2212,300	1,000	378,160	0,171	356,690	0,161	574,650	0,260	692,970	0,313	1189,700	0,538	1758,300	0,795
20000513	1088,200	0,564	1928,200	1,000	390,250	0,202	331,510	0,172	466,050	0,242	518,200	0,269	886,300	0,460	1750,200	0,908
20000606	1033,200	0,575	1796,300	1,000	408,200	0,227	333,210	0,185	485,200	0,270	492,920	0,274	821,520	0,457	1613,200	0,898
20000726	985,250	0,569	1730,200	1,000	382,510	0,221	322,210	0,186	502,350	0,290	483,060	0,279	880,210	0,509	1523,200	0,880
20000728	1120,320	0,521	2148,500	1,000	410,920	0,191	385,540	0,179	621,250	0,289	672,250	0,313	1178,200	0,548	1692,300	0,788
20000804	831,320	0,577	1440,300	1,000	321,250	0,223	301,280	0,209	321,240	0,223	392,720	0,273	683,270	0,474	1081,360	0,751
Valor medio	1034,276	0,572	1817,065	1,000	376,547	0,208	328,011	0,181	486,626	0,267	525,432	0,289	940,963	0,516	1547,495	0,850
% RSD	8,486	5,612	11,452	0,000	10,914	9,354	12,553	11,003	18,592	12,698	16,851	11,766	18,292	12,061	14,739	8,647

Tabla 3. Datos estadísticos de 8 picos obtenidos de las huellas dactilares de 20 lotes de DSP

Pico nº	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo	Probabilidad de aparición	Área	Relación de áreas	Intervalo de la relación de áreas
1	8,289	0,672	100%	1034,276	0,572	0,572 ± 0,096
2	12,343	1,000	100%	1817,065	1,000	1,000 ± 0,000
3	17,493	1,417	100%	376,547	0,208	0,208 ± 0,040
4	18,664	1,512	100%	328,011	0,181	0,181 ± 0,059
5	24,883	2,016	100%	486,626	0,267	0,267 ± 0,097
6	27,586	2,235	100%	525,432	0,289	0,289 ± 0,052
7	29,714	2,407	100%	940,963	0,516	0,516 ± 0,125
8	34,030	2,757	100%	1547,495	0,850	0,850 ± 0,163

Análisis cuantitativo de Danshensu en la DSP

5

Cromatografía y condiciones, aparatos y reactivos adaptados:

1. Preparación de las zonas de huella dactilar

10 (1) Parámetros del cromatograma y ajuste del sistema.

Se usó silico-18 conectado por alquilsilano como material de relleno, y agua-acetonitrilo-ácido acético glacial (87:12:1) como fase móvil. La longitud de onda de detección se fijó en 281 nm. El número de platos teóricos no debe ser inferior a 2500 calculado con el pico de Danshensu, y el grado de separación debe cumplir los requisitos.

15

(2) Aparato y reactivos

Cromatógrafo: Cromatógrafo de Líquidos HP 1100

Detector: detector de ultravioleta HP tipo VWD

20 Columna: columna ODS 5 u, 250 x 4,6 mm, Alltech Company

Pre-columna: pre-columna Alltima C18 5u, Alltech Company

Temperatura de la columna: 30°C

Acetonitrilo: puro para cromatografía, Tianjin Siyou Biomedical & Technical Co. Ltd.

Ácido acético glacial: puro para análisis, Tianjin Tianhe Reagent Company.

25

(3) Preparación de la muestra de control.

Se usan 25,0 mg de sal de sodio del ácido salviánico y 5,0 mg de aldehído protocatéquico como muestras de control: Se pesan ambas muestras con precisión y se ponen en los matraces aforados de 50 ml. Se añade la fase móvil para disolverlos y se diluyen las disoluciones hasta la marca de graduación de los matraces, se agitan bien y se guardan como las disoluciones madre. Se pesa una pequeña cantidad de ácido para-aminobenzoico con precisión, se disuelve como una disolución de 0,2 mg/ml con la fase móvil y se toma como la disolución madre de referencia interna. Se toman mediante pipeta cantidades adecuadas de las disoluciones de sal de sodio del ácido salviánico A, aldehído protocatéquico y referencia interna con lecturas precisas de sus volúmenes, se diluyen con la fase móvil para preparar una disolución que contiene 50 µg de sal de sodio del ácido salviánico A, 10 µg de aldehído protocatéquico y 80 µg de ácido para-aminobenzoico. La disolución así preparada se tomó como la disolución de control.

35

(4) Preparación de la muestra de ensayo.

40

Se cogen 10 píldoras de la píldora cardiotónica y 1 ml de disolución madre de referencia interna, se ponen en un matraz aforado de 25 ml, se disuelven en la fase móvil y se diluye la disolución hasta la marca de graduación.

Se cogen 10 ml de las disoluciones de las muestras de control y de ensayo, respectivamente, se inyectan y se registra el cromatograma.

45

Preparación de la disolución de control: Se cogen y pesan con precisión 25,0 mg de tanshinol de sodio, se ponen en un matraz aforado. Se añade la fase móvil y se disuelve y diluye hasta la marca de graduación. Se agita la disolución, y se guarda como la disolución madre de control. Se pesa con precisión el ácido para-aminobenzoico y

se diluye hasta una disolución de 0,2 mg/ml con la fase móvil. Se guarda la disolución como la disolución madre de referencia interna. Se cogen las dosis adecuadas de la disolución madre de control y la disolución madre de referencia interna, y se forma con ellas la disolución de control que comprende 50 µg de tanshinol de sodio y 80 µg de ácido para-aminobenzoico por mililitro.

5

Preparación de la disolución de ensayo: Se cogen 10 píldoras de este artículo y 1 ml de disolución madre interna. Se ponen en un matraz aforado de 25 ml, se disuelven hasta la graduación y se forma la disolución de ensayo.

Se cogen 10 l de la disolución de control y 10 l de la disolución de ensayo respectivamente, se toma nota de las huellas dactilares y se calculan los resultados.

10

La composición herbaria que comprende DSP debería contener 0,14-0,18 mg de Danshensu por píldora.

Análisis cuantitativo del ginsenósido Rg1 y sanchinósido R1 en la DSP

15

(1) Sistema cromatográfico e idoneidad del sistema

Se usó silico-18 conectado por alquilsilano como fase estacionaria y la mezcla de agua y acetonitrilo como fase móvil. La concentración de acetonitrilo era 25% desde 0 a 15 min, y 35% después del minuto 15. El caudal del gas nebulizador era 2,5 litros por min y la temperatura del tubo de deriva se fijó en 93,8°C. El número de platos teóricos de la columna no era inferior a 5000 calculado con el pico del ginsenósido Rg1.

20

(2) Aparato y reactivos

25 Cromatógrafo: Cromatógrafo de líquidos Agilent 1100

Detector: detector ELSD 2000 Alltech (detector evaporativo de dispersión de luz)

Columna: columna ODS-C₁₈, 5 u, 250 x 4,6 mm, Alltech Company

Pre-columna: pre-columna Alltima C₁₈ 5u, Alltech Company

Temperatura de la columna: 30°C

30

(3) Preparación de la muestra de control

Se disolvieron el ginsenósido Rg1 y sanchinósido R1 respectivamente en metanol para producir dos disoluciones de control, que contenían 0,98 mg y 0,25 mg por ml, de forma correspondiente.

35

(4) Preparación de la muestra de ensayo

Se ponen 50 píldoras de la píldora cardiotónica en un matraz aforado de 5 ml, se añade amoniaco al 4% hasta la marca de graduación, se trata con ultrasonidos durante 20 min y se aplica la disolución a una columna C₁₈ pequeña previamente preparada (columna STRATA C18-E de Phenomenex Company, 500 mg y tubo de 3 cc), se eluye con 10 ml de agua, se descarta el eluato, después se eluye con 2 ml de metanol, se recoge el eluato en un matraz aforado y se diluye hasta la marca de graduación con metanol, la disolución se toma como la disolución de ensayo.

40

(5) Procedimiento

45

Se inyectan con precisión 10 µl de cada una de las disoluciones de control y la disolución de ensayo, respectivamente, en la columna, se registra el cromatograma y se calcula el contenido.

(6) Resultado

50

Se ensayaron 20 lotes de muestras de píldoras cardiotónicas con el procedimiento descrito antes, y los datos estadísticos se muestran en la tabla 4. Basándose en la siguiente tabla, la composición herbaria que comprende la DSP contiene 0,401%-0,712%, media 0,550% de sanchinósido R1 y 2,069%-4,044%, media 2,847% de ginsenósido Rg1.

55

Tabla 4. Cantidades de ginsenósido Rg1 y sanchinósido R1 en la DSP

Lote nº	Sanchinósido R1 (µg/píldora)	Ginsenósido Rg1
20000106	17,22	80,93
20000216	16,92	80,78
20000323	15,16	70,76
20000406	13,65	62,51
20000422	14,24	68,72
20000513	15,27	71,16
20000606	14,86	68,21
20000726	14,59	72,35
20000728	14,25	57,37
20000804	15,30	70,55
Valor medio	15,15	70,33
% RSD	7,53	9,67
no inferior a	12,12	56,26

5 Las características de la DSP así fabricada son las siguientes:

- (a) La DSP contiene ácido b-3,4-dihidroxifenil-láctico, danshensu de sodio, saponina y borneol,
- (b) es negativa para bacterias: contiene menos de 1.000 bacterias,
- (c) negativa para hongos: contiene menos de 100 hongos,
- 10 (d) negativa para metales pesados: contienen menos de la cantidad segura definida por el Gobierno Chino.
- (e) La semivida de la DSP es 4 años a temperatura ambiente.

ESTUDIOS CLÍNICOS DE LA DSP

15 La angina de pecho se evalúa por la anamnesis de la angina de pecho, nivel de lípidos en el suero, electrocardiograma (ECG), ECG de ejercicio, evaluación por gammagrafía de isquemia, angiografía coronaria, etc. Mediante la evaluación de la eficacia terapéutica usando estos criterios de valoración, se ha mostrado que la DSP es eficaz para tratar la angina de pecho.

20 La DSP es eficaz para la angina de pecho

Se trataron 157 pacientes con cardiopatía coronaria con 10 DSP tres veces al día, por administración oral durante 4 semanas. Al evaluar la frecuencia, intensidad y duración de la angina de pecho, la sensación de opresión en el pecho y palpitaciones, los síntomas habían desaparecido o remitido en 95,3% de los pacientes.

25

La DSP es más eficaz que los comprimidos Dan Shen para aliviar la angina de pecho

El comprimido Dan Shen es otro medicamento chino para tratar la angina de pecho que se usa actualmente en China. Se compararon la eficacia de la DSP y el comprimido Dan Shen. Los pacientes con cardiopatía coronaria se dividieron aleatoriamente en dos grupos. 107 pacientes se trataron con la DSP y 50 pacientes se trataron con el comprimido Dan Shen. Al comparar la frecuencia de las crisis anginosas y el consumo de nitratos, la DSP era más eficaz que los comprimidos Dan Shen para tratar la angina de pecho. Véase la siguiente Tabla 5.

35

Tabla 5. Comparación de la DSP y el comprimido Dan Shen

	Número de pacientes	
	Totales	Sensibles
DSP	107	102 (95,3%)
Comprimido Dan Shen	50	38 (76%)

Habiendo probado que la DSP es más eficaz que los comprimidos Dan Shen, se comparó la eficacia de la DSP con diferentes fármacos que se usan actualmente para tratar la angina de pecho crónica estable en EE.UU.

40 Comparación de la DSP y la nitroglicerina

La nitroglicerina se usa con frecuencia para aliviar la angina de pecho. Se comparó la eficacia de la DSP y la

nitroglicerina para aliviar la angina de pecho. Al inicio de la angina de pecho, los pacientes se trataron con DSP o nitroglicerina, y se comparó el tiempo necesario para aliviar la angina de pecho. Tanto la DSP como la nitroglicerina alivian la angina de pecho en todos los pacientes en 15 min. La eficacia de la DSP era ligeramente menor que la nitroglicerina. Véase la siguiente tabla 6.

5

Tabla 6. Comparación de la DSP y la nitroglicerina

	Nº de pacientes que responden en		
	1-5 min	6-10 min	11-15 min
DSP	11	14	5
Nitroglicerina	17	12	1
Total: 30 pacientes por grupo			

La DSP no cambia la frecuencia cardiaca

10

Los datos demuestran que la DSP alivia de forma eficaz la angina de pecho. Se examinó si la DSP aliviaba la angina de pecho por disminución de la frecuencia cardiaca. La frecuencia cardiaca después del tratamiento con DSP era equivalente a la frecuencia antes del tratamiento, lo que indica que la DSP alivia la angina de pecho sin afectar a la frecuencia cardiaca (tabla 7).

15

Tabla 7. La DSP no afecta a la frecuencia cardiaca

	Frecuencia cardiaca	
	Antes de tratamiento	Después de tratamiento
DSP	84,3 ± 23,1	82,8 ± 22,8

Comparación de la eficacia de la DSP con el nitrato dinitrato de isosorbida

20

Habiendo probado que la DSP alivia la angina de pecho de forma tan eficaz como la nitroglicerina, se examinó si la DSP podría prevenir la angina de pecho. Se comparó la eficacia de la DSP y el nitrato dinitrato de isosorbida. El dinitrato de isosorbida es un nitrato de acción prolongada usado con frecuencia para prevenir la angina de pecho crónica estable en EE.UU. Los pacientes se trataron con DSP tres veces al día, por vía oral, 10 píldoras por tratamiento, o dinitrato de isosorbida tres veces al día, por vía oral, 10 mg por tratamiento. Se examinó la función cardiaca y el electrocardiograma.

25

Función cardiaca

Se evaluó la eficacia de la DSP y los nitratos en la función cardiaca midiendo el gasto cardiaco (CO), volumen sistólico por minuto (SV), fracción de sangre expulsada (EF), fracción de acortamiento del eje corto del ventrículo izquierdo (FS). La DSP mejora la función cardiaca más eficazmente que los nitratos. Véase la siguiente tabla 8.

30

Tabla 8. Efecto de la DSP y los nitratos en la función cardiaca

35

	DSP		Dinitrato de isosorbida	
	Antes	Después	Antes	Después
SV	75,38 ± 8,32	83,45 ± 9,11	74,96 ± 8,44	79,47 ± 8,72
CO	5,61 ± 1,34	6,94 ± 1,36	6,54 ± 1,36	6,12 ± 1,41
EF	0,57 ± 0,02	0,79 ± 0,02	0,59 ± 0,03	0,70 ± 0,03
FS	17,14 ± 3,4	16,69 ± 3,6	17,32 ± 3,1	18,46 ± 4,2
Antes: antes de tratamiento				
Después: después de tratamiento				

La DSP mejora el ECG

La tasa efectiva de ST-T se evaluó registrando la frecuencia de cambio en el segmento ST-T. Tanto la DSP como los dinitratos de isosorbida disminuyeron la frecuencia de cambio en el ST-T de forma significativa. Sin embargo, la DSP era más eficaz. Véase la tabla 9 a continuación.

40

Tabla 9. Comparación del efecto de la DSP y el nitrato en el ECG

	Frecuencia del cambio de ST-T	
	Antes de tratamiento	Después de tratamiento
DSP	131	35
Dinitrato de isosorbida	129	42

5 Comparación de la DSP y la aspirina en la reducción de la estasis sanguínea

La hemorragia en las lesiones ateroscleróticas induce la activación de plaquetas, trombosis coronaria y estasis sanguínea que producen el flujo sanguíneo deteriorado. Por lo tanto, para mejorar el flujo sanguíneo, se recomienda la administración crónica del inhibidor de la activación de plaquetas, la aspirina, a los pacientes con angina de pecho. Se comparó la eficacia de la DSP y la aspirina en la mejora del flujo sanguíneo, evaluando [Hb, Lb, P y flujo de aire]. La DSP mejora el flujo sanguíneo de forma tan eficaz como la aspirina. Véase la tabla 10 a continuación.

Tabla 10. La DSP y la aspirina mejoran el flujo sanguíneo

	DSP		Aspirina	
	Antes	Después	Antes	Después
Hb	6,23 ± 1,67	4,35 ± 1,02	6,12 ± 1,56	4,28 ± 1,07
LB	10,92 ± 2,21	8,30 ± 1,14	10,38 ± 1,96	8,21 ± 0,3
P	1,95 ± 0,08	1,77 ± 0,08	1,89 ± 0,12	1,67 ± 0,7
Flujo de aire	1,79 ± 0,13	1,39 ± 0,11	1,82 ± 0,17	1,40 ± 0,10
Número total de pacientes: 25 para la DSP y 28 para la aspirina				

15

La DSP reduce la estasis sanguínea inhibiendo la activación de plaquetas

El tromboxano B2 activa las plaquetas. Las plaquetas activadas liberan diferentes sustancias incluyendo la β -microglobulina de plaquetas, que produce la estasis sanguínea, deteriorando así el flujo sanguíneo. Se examinó la eficacia de la DSP en la inhibición de la activación de plaquetas. La DSP reduce la concentración de tromboxano B2 e inhibe la agregación de plaquetas de forma eficaz. El dinitrato de isosorbida, que se sabe que no puede inhibir la activación de plaquetas y se usa por lo tanto como control, no reducía el tromboxano B2 ni inhibía la activación de plaquetas. Véase la tabla 11 a continuación.

25

Tabla 11. La DSP inhibe la activación de plaquetas

		Antes de tratamiento	Después de tratamiento
β PM	DSP	62,44 ± 14,37	45,65 ± 12,25
	nitratos	59,89 ± 15,42	54,36 ± 13,18
Tx β 2	DSP	1312 ± 535	738 ± 384
	nitratos	1315 ± 507	1218 ± 445

La DSP reduce el nivel de colesterol plasmático

El aumento del colesterol plasmático se ha implicado en el inicio de la aterosclerosis. Para prevenir la formación de nuevas lesiones ateroscleróticas, se recomendaba la disminución del colesterol plasmático sea modificando la dieta o mediante fármacos. Se examinó si la DSP reducía el colesterol plasmático. La DSP reducía el nivel de colesterol en 0,3 mmol/l, lo cual es estadísticamente significativo con el valor P de 0,05. Véase la tabla 12 a continuación.

35

Tabla 12. La DSP reduce el colesterol plasmático

	Colesterol plasmático (mmol/l)	
	Antes de tratamiento	Después de tratamiento
DSP	5,15 ± 0,16	4,84 ± 0,2
Número de pacientes: 80		

Efecto de la píldora cardiotónica en LPO y SOD en el suero sanguíneo de pacientes que padecen cardiopatía coronaria

5 Procedimiento: en el grupo de tratamiento, se administra a 24 pacientes, de acuerdo con los estándares de referencia de diagnóstico chinos para la cardiopatía coronaria modificados en 1979, la píldora cardiotónica, 10 píldoras/vez y 3 veces/día. En el grupo normal, 20 personas sanas no reciben ningún tratamiento médico.

10 Resultados: El nivel de LPO de los pacientes que padecen cardiopatía coronaria es claramente mayor que el de las personas sanas, mientras que el contenido de SOD es claramente inferior ($p < 0,01$). Después de tratar a los pacientes con la píldora cardiotónica, sus LPO claramente disminuyen ($p < 0,01$), y su SOD claramente aumenta ($p < 0,01$). Véase la tabla 13 a continuación.

Tabla 13. Comparación del contenido de SOD y LPO en los grupos normal y de tratamiento ($x \pm s$)

Grupos	Pacientes	SOD (ng/ml)		LPO (nmol/ml)
Grupo normal	20	348±106		4,64±1,52
Grupo de tratamiento	24	Antes de tratamiento	267±76*	7,16±1,48*
		Después de tratamiento	309±87#.	4,68±1,72##

Nota: En comparación con el grupo normal, * $p < 0,05$. En comparación con el de antes de tratamiento, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$.

15 Conclusión: La isquemia crónica de los músculos cardiacos de pacientes que padecen cardiopatía coronaria y anoxia tisular conducía a la reducción de la actividad de la SOD, en especial la de la SOD extracelular, y al aumento de los radicales libres de oxígeno, lo que produce el aumento de los LPO y consumo de SOD adicional. Después de tratar a los pacientes con la píldora cardiotónica, el nivel de LPO disminuye claramente, mientras que el contenido de SOD aumenta de forma obvia. Esto prueba que la píldora cardiotónica tiene una acción fuerte de eliminación de radicales libres de oxígeno, que también es uno de los mecanismos para tratar la cardiopatía coronaria.

Efecto de la píldora cardiotónica en LPO y antioxidasas en el tratamiento de la enfermedad cardiopulmonar

25 Procedimiento: sujetos: 48 pacientes que padecían enfermedad cardiopulmonar se dividen aleatoriamente en 3 grupos. En el grupo normal, 16 pacientes se tratan con un complejo de terapias, tales como terapia antiinflamatoria, antiasmática, inhalación de oxígeno, etc. En el grupo de la píldora cardiotónica, 14 pacientes se tratan con la píldora cardiotónica, 10 píldoras/vez y 3 veces/día. En el grupo de Gantangzhi, 18 pacientes se tratan con goteo intravenoso de 200 mg de Gantangzhi disueltos en 250 ml de inyección de glucosa al 5%, 1 vez/día, y 10 días/periodo.

30 Resultados: Después de tratamiento con la píldora cardiotónica, el valor de GSH-Px aumenta, el valor de LPO disminuye, y por lo tanto, GSH-Px/LPO aumenta. En comparación con el grupo de tratamiento normal, hay una diferencia significativa. Véase la tabla 14 a continuación.

35 Tabla 14. Índices antes y después de tratamientos

		GSH-Px (U/mg Hb)	CAT (U/g Hb)	SOD (U/g Hb)	LPO (nmol/ml)	GSH-Px/LPO
Grupo de personas sanas		140,6 ± 35,2	312,7 ± 58,1	5799,8 ± 948	4,2 ± 1,2	34,2 ± 8,7
Grupo normal	Antes de tratamiento	101,3 ± 23,6	300,4 ± 107,7	5740,5 ± 939,0	5,6 ± 1,9	20,4 ± 8,8
	Después de tratamiento	120,6 ± 20,6#	390 ± 184,3#	6076,8 ± 1091	4,3 ± 1,2##	31,3 ± 15,1##
Grupo de píldora cardiotónica	Antes de tratamiento	108,8 ± 28,3	233,1 ± 70,2	5863,3 ± 1072,7	5,9 ± 2,0	18,5 ± 7,6
	Después de tratamiento	158,2 ± 40,7###*	328,4 ± 78,5###*	5582,8 ± 1094,7#*	4,1 ± 1,6###*	364 ± 67###*

Nota: Comparación de los de antes de tratamiento con los de después de tratamiento, # $p > 0,05$, ## $p < 0,05$, * $p > 0,05$, ** $p < 0,05$.

40 Conclusión: la píldora cardiotónica tiene la función de antioxidación, y puede reducir la reacción de peroxidación lipídica y aumentar la capacidad de antioxidación del cuerpo humano.

Tratamiento con la píldora cardiotónica de la hipertensión esencial

Procedimiento:

5 (1) Elección de los pacientes: Seleccionar los pacientes que padecen hipertensión esencial en fase I o II, pero sin hipertensión secundaria o cardíaca, insuficiencias hepática o renal.

(2) Administración: Interrumpir la ingestión por los pacientes de cualquier medicina occidental o tradicional china (excepto los hipotensores) durante dos semanas, y después, en la tercera semana medir sus presiones arteriales e
 10 índices reológicos de la sangre y anotar sus manifestaciones clínicas. Se adopta el procedimiento de doble ciego. En el grupo de la píldora cardiotónica, los sujetos toman la píldora cardiotónica por vía oral, 10 píldoras/vez y 3 veces/día. En el grupo del compuesto del comprimido Danshen, los sujetos toman el compuesto del comprimido Danshen por vía oral, 5 comprimidos/vez y 3 veces/día. Los sujetos en el grupo de control toman placebos, y el periodo de tratamiento es 6 semanas.

15

Resultados:

(1) Efecto en la viscosidad de la sangre entera. Después de tratamiento, las viscosidades de la sangre entera de los pacientes tanto en el grupo de la píldora cardiotónica como en el grupo del compuesto del comprimido Danshen,
 20 disminuyeron notablemente, pero las curvas de las viscosidades de la sangre entera en el grupo de la píldora cardiotónica a cualquier velocidad de cizalladura disminuye más rápidamente que las del compuesto del comprimido Danshen. Véase la tabla 15.

25

Tabla 15. Efecto de la píldora cardiotónica en la viscosidad de la sangre entera (mPa, $x \pm s$)

Grupos		3,83 s ⁻¹	28,3 s ⁻¹	192 s ⁻¹
Grupo cardiotónico (30 sujetos)	Antes de tratamiento	18,27 ± 2,85	5,82 ± 0,93	4,54 ± 0,78
	Después de tratamiento	11,79 ± 3,75**##&&	4,78 ± 0,84**##&&	3,98 ± 0,65**##&&
Grupo del compuesto de comprimido Danshen (30 sujetos)	Antes de tratamiento	17,69 ± 1,96	5,86 ± 0,79	4,69 ± 0,54
	Después de tratamiento	14,68 ± 3,41**&&	5,69 ± 0,81*&	4,42 ± 0,59**&&
Grupo de control (15 sujetos)	Antes de tratamiento	17,65 ± 2,07	5,69 ± 0,79	4,75 ± 0,58
	Después de tratamiento	18,02 ± 2,32	5,71 ± 2,76	4,86 ± 0,65

Nota: En comparación con los del mismo grupo antes de tratamiento, *p<0,05, **P<0,01. Comparación con los del grupo de la píldora cardiotónica después de tratamiento, #p<0,05, ##p<0,01. Comparación con los del grupo de control después de tratamiento, &p<0,05, &&p<0,01.

(2) Efecto en la deformación y la agregación de eritrocitos. Después de tratamiento, la deformación de eritrocitos en el grupo de la píldora cardiotónica es notablemente mayor que en el de antes de tratamiento, y el área y el índice de agregación son visiblemente menores que los de antes de tratamiento. Y en comparación con el grupo del
 30 compuesto del comprimido Danshen, el grupo de la píldora cardiotónica disminuye mucho más rápido (p<0,01). Véase la tabla 16.

Tabla 16. Efecto de la píldora cardiotónica en la deformación y la agregación de eritrocitos (x ± s)

Grupos		Índice de deformación	Índice de agregación	Área de agregación (integral)
Grupo cardiotónico (30 sujetos)	Antes de tratamiento	0,4115 ± 0,0360	4,06 ± 0,39	841,12 ± 67,68
	Después de tratamiento	0,4274 ± 0,034*&	3,41 ± 0,36**##&&	683,52 ± 69,09**##&&
Grupo del compuesto de comprimido Danshen (30 sujetos)	Antes de tratamiento	0,4066 ± 0,0290	3,98 ± 0,34	806,90 ± 66,30
	Después de tratamiento	0,4180 ± 0,0281*&	3,64 ± 0,39**&&	716,12 ± 84,29**&
Grupo de control (15 sujetos)	Antes de tratamiento	0,4091 ± 0,0376	4,02 ± 0,41	812,52 ± 65,64
	Después de tratamiento	0,4001 ± 0,0381	4,01 ± 0,39	804,44 ± 68,06

Nota: En comparación con los del mismo grupo antes de tratamiento, *p<0,05, **P<0,01. Comparación con los del grupo de la píldora cardiotónica después de tratamiento, #p<0,05, ##p<0,01. Comparación con los del grupo de control después de tratamiento, &p<0,05, &&p<0,01.

5 (3) Efecto en la presión arterial. Después de tratamiento, las presiones sistólicas y presiones diastólicas de los pacientes tanto en el grupo de la píldora cardiotónica como el grupo del compuesto del comprimido Danshen disminuyeron notablemente (p<0,01), y no hay una diferencia evidente entre los dos grupos. Véase la tabla 17.

10 (4) Efecto en los síntomas de la hipertensión. Los pacientes tanto en el grupo de la píldora cardiotónica como en el grupo del compuesto del comprimido Danshen mejoran mucho en términos de síntomas tales como cefalea, mareo y extremidades adormecidas (p<0,01), pero no mejoran en el insomnio. Véase la tabla 18.

Tabla 17. Efecto de la píldora cardiotónica en la presión arterial (mm Hg, x ± s)

Grupos		Presión sistólica	Presión diastólica
Grupo cardiotónico (30 sujetos)	Antes de tratamiento	155,00 ± 8,08	90,70 ± 7,93
	Después de tratamiento	149,20 ± 8,89**&&	86,59 ± 8,30**&&
Grupo del compuesto de comprimido Danshen (30 sujetos)	Antes de tratamiento	152,93 ± 9,59	92,59 ± 8,30
	Después de tratamiento	146,02 ± 10,20**&&	88,55 ± 7,22**&&
Grupo de control (15 sujetos)	Antes de tratamiento	154,06 ± 7,05	90,90 ± 9,10
	Después de tratamiento	152,08 ± 9,25	91,10 ± 8,70

Nota: En comparación con los del mismo grupo antes de tratamiento, **P<0,01. Comparación con los del grupo de control después de tratamiento, &&p<0,01.

15

Tabla 18. Efectos de la píldora cardiotónica en los síntomas clínicos de hipertensión (pacientes)

Grupos		Cefalea		Mareo		Extremidades adormecidas		Insomnio	
		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
Grupo cardiotónico (30 sujetos)	Antes de tratamiento	20	10	16	14	12	18	8	22
	Después de tratamiento	7	23*	2	28*	3	27*	4	26
Grupo del compuesto de comprimido Danshen (30 sujetos)	Antes de tratamiento	22	8	17	13	10	20	6	24
	Después de tratamiento	15	15*	8	22*	3	27*	6	248
Grupo de control (15 sujetos)	Antes de tratamiento	8	7	6	9	4	11	4	11
	Después de tratamiento	7	8	5	10	3	12	2	13

Nota: En comparación con los del mismo grupo antes de tratamiento, **P<0,01.

Conclusión: La propiedad reológica de los eritrocitos de los pacientes que padecen hipertensión esencial es

claramente anormal. La deformación de los eritrocitos disminuye claramente, mientras que la agregación aumenta claramente. El experimento muestra que la píldora cardiotónica tiene las funciones de reducir notablemente la viscosidad de la sangre entera y el índice y el área de agregación de los eritrocitos, y aumenta mucho la capacidad de deformación de los eritrocitos. La píldora cardiotónica también puede reducir la presión arterial y mejorar los 5 síntomas clínicos de los pacientes. Y por lo tanto, la píldora cardiotónica tiene un gran beneficio para prevenir o posponer la aparición de la hipertensión esencial y el síndrome cardiocerebral.

Toxicidad

10 La DSP es segura y no es tóxica. En China, alrededor de 5 millones de pacientes se han tratado con la DSP sin efectos secundarios graves. Se han descrito efectos secundarios leves, cefalea o mareo, en una proporción minoritaria de pacientes.

Resumen de los estudios clínicos

15 La DSP es una medicina china de nueva generación para tratar la cardiopatía coronaria. Los estudios clínicos demuestran que la DSP alivia así como previene la angina de pecho mejorando la función cardiaca, reduciendo la isquemia miocárdica, inhibiendo la activación de plaquetas reduciendo así la estasis sanguínea, y disminuyendo el colesterol plasmático. La eficacia terapéutica de la DSP era superior a otra forma de medicamento chino, los 20 comprimidos Dan Shen. La DSP es tan eficaz como los fármacos usados en EE.UU. La DSP alivia la angina de pecho de forma tan eficaz como la nitroglicerina, previene la angina de forma tan eficaz como el dinitrato de isosorbida de acción prolongada, e inhibe la agregación de plaquetas de forma tan eficaz como la aspirina. La DSP no es tóxica: alrededor de 5 millones de personas se han tratado sin efectos secundarios evidentes en la mayoría de los casos.

25 **ESTUDIOS PRECLÍNICOS**

Los estudios preclínicos ponen de manifiesto el mecanismo por el que la DSP previene así como alivia la angina de pecho.

30 La DSP alivia la angina de pecho aumentando el flujo sanguíneo

Ratas Wistar, de aproximadamente 260 g, se anestesiaron con uretano, se abrió el pecho, se extrajo el corazón, y se perfundió en el modo de Lagendorff a 37°C. Con presión de perfusión coronaria constante de 65 cm de H₂O.

35 Después de estabilizar la frecuencia cardiaca, se aplicaron diferentes cantidades de DSP o comprimido Danshen cada vez a través de la rama lateral de la cánula de la aorta. Posteriormente, se midieron el flujo coronario y la frecuencia cardiaca. La DSP aumentó el flujo coronario con una amplia dosificación. Por otra parte, el comprimido Danshen aumentó el flujo coronario con una dosificación estrecha. Véase la tabla 19 a continuación.

40 Tabla 19. La DSP aumenta el flujo coronario

	Dosis (mg/ml)	Flujo coronario	
		Antes de tratamiento	Después de tratamiento
DSP	Nada	7,0 ± 1,1	7,1 ± 0,97
	5,8	7,2 ± 1,1	7,0 ± 1,4
	290	6,7 ± 1,6	8,7 ± 1,4
	580	6,7 ± 1,5	9,3 ± 2,9
Comprimido DS	5,8	6,7 ± 1,4	7,1 ± 1,5
	290	7,3 ± 1,7	9,1 ± 2,1
	580	6,8 ± 1,4	7,1 ± 1,5

Se examinó el efecto de la DSP y los comprimidos Danshen en la frecuencia cardiaca. Ni la DSP ni el comprimido 45 Danshen cambiaron la frecuencia cardiaca. Véase la tabla 20 a continuación.

Tabla 20. La DSP no aumenta la frecuencia cardiaca

	Dosis (mg/ml)	Frecuencia cardiaca	
		Antes de tratamiento	Después de tratamiento
DSP	Nada	194 ± 17	193 ± 12
	5,8	180 ± 11	189 ± 9
	290	188 ± 7	184 ± 8
	580	173 ± 14	167 ± 13 5,8
Comprimido DS	5,8	180 ± 11	189 ± 9
	290	189 ± 16	183 ± 14
	580	186 ± 23	171 ± 8

5 La DSP aumenta el flujo coronario relajando el músculo liso vascular y dilatando así los vasos

Se examinó el efecto de la DSP en la vasoconstricción inducida por potasio de tira aórtica de conejo. La DSP relajó el músculo liso dilatando así significativamente los vasos. Se observaron efectos similares en los experimentos usando anillos de arteria coronaria de cerdo.

10

La DSP inhibe la agregación de plaquetas

Se examinó el efecto de la DSP en la agregación de plaquetas. Las plaquetas de conejo se trataron con DSP y se examinó la agregación. La DSP inhibía la agregación de plaquetas de forma significativa. Véase la tabla 21 a

15

continuación.

Tabla 21. La DSP inhibe la agregación de plaquetas

DSP (mg/ml)	nº de animales	Tasa de agregación (%)	Inhibición (%)
0	6	6,7 ± 4,4	0
1,8	6	42,7 ± 2,5	8,3 ± 4,5
3,5	6	33,4 ± 3,4	23,6 ± 6,7*
7	6	25,3 ± 2,1	37,6 ± 5,9*
14	6	15,8 ± 3,0	69,0 ± 6,9*

20 La tabla 22 muestra las tasas de micronúcleos en ratones, en diferentes tiempos después de tratamiento con la composición herbaria de esta invención (8400 mg/kg).

Tabla 22

Tiempo (h)	RBC policromáticos	Células con micronúcleos	Micro-tasas (%) (x ± SD)
12	6.000	9	1,5 ± 0,8
24	6.000	11	1,8 ± 0,7
36	6.000	11	1,8 ± 1,2
48	6.000	11	1,8 ± 1,5
72	6.000	13	2,2 ± 0,7
Disolvente 24	6.000	9	1,5 ± 1,4

25

La tabla 23 muestra las tasas de micronúcleos en ratones 24 h después de la administración de DSP y CP.

Tabla 23

Dosis (mg/kg)	RBC policromáticos	Células con micronúcleos	Micro-tasas (%) (x ± SD)
8.400	6.000	12	2,0 ± 0,6
840	6.000	9	1,5 ± 1,0
84	6.000	11	1,8 ± 1,0
Disolvente	6.000	9	1,5 ± 1,4
CP (80 mg/kg)	6.000	138	23,0 ± 4,0*

*Comparar con disolvente P<0,01

La tabla 24 muestra los criterios de evaluación para la eficacia clasificada de los fármacos ensayados.

Tabla 24.

5

Parámetros\Efectos	Efecto muy alto	Efecto alto	Efecto	Sin efecto
Estado de agregación de RBC	No	Un poco	Notable	Grave
Tiempo de inicio	<90	90-180	180-300	>300
Estado de microflujo sanguíneo	Mejor que normal	Se vuelve normal	Mejorado	Deteriorado
Duración (min)	>15	15-10	10-5	<5

La DSP mejora la microcirculación

Se examinó el efecto de la DSP en la microcirculación en hámsteres chinos. La DSP mejoró la microcirculación durante 23 min en los 111 minutos de administración bucal en todos los animales. Véase la tabla 25 a continuación.

10

Tabla 25. La DSP mejora la microcirculación

	Tiempo de inicio (min)	Duración (min)	Tasa de efecto (%)
DSP	111	23	100

La tabla 26 muestra el efecto protector de la DSP en el miocardio inducido por pituitrina en ratas (segundo periodo)

15

Tabla 26. (n=8)

Grupo	Dosificación (g/kg)	Antes de medicación	Después de medicación	
			Antes de pituitrina	Después de pituitrina (40 s-15 min) Número de ratas con ECG anormal
Control		Normal	Normal	7
DSP	0,4	Normal	Normal	3*
	0,8	Normal	Normal	1**
	1,2	Normal	Normal	1**
DST	0,4	Normal	Normal	4
	0,8	Normal	Normal	1**

Comparado con el control. *p<0,05; **p<0,01.

La tabla 27 muestra el efecto inhibitor de la DSP en la isquemia miocárdica inducida por pituitrina en la rata.

20

Tabla 27

Grupo	Dosificación (g/kg)	Inhibición (%)
DSP	0,4	71,4*
	0,8	85,7*
	1,2	71,4*
DST	0,4	42,8*
	0,8	85,7*

Comparado con el control, *p<0,05,

La tabla 28 muestra el efecto protector de la DSP en la isquemia miocárdica inducida por pituitrina en ratas (primer periodo).

25

Tabla 28 (n=8)

Grupo	Dosificación (g/kg)	Cambios en T-ST del ECG (derivación II) en el primer periodo				
		Antes de medicación	Después de medicación			
			Antes de pituitrina	Después de pituitrina (0 -40 s) Número de ratas con ECG anormal		
				T elevada	T invertida	Total
Control	-	Normal	Normal	4	3	7
DSP	0,4	Normal	Normal	3	0	3*
	0,8	Normal	Normal	1	1	2*
	1,2	Normal	Normal	2	1	3*
DST	0,4	Normal	Normal	3	2	5
	0,8	Normal	Normal	1	1	2*

Comparado con el control. *p<0,05; **p<0,01.

5 Acción de la píldora cardiotónica en la eliminación de radicales libres de oxígeno

El estudio de la acción de la píldora cardiotónica en la eliminación de radicales libres de oxígeno se lleva a cabo usando resonancia paramagnética electrónica (EPR) y captura de espín, con aniones superóxido y radicales hidroxil producidos usando el sistema de xantina-xantina oxidasa y el sistema de $H_2O_2-Fe^{2+}$ respectivamente.

10

Procedimiento:

(1) Producción de radicales hidroxil. Se monta un modelo de ensayo de acuerdo con el principio de Fenton. Se mezclan H_2O_2 , sulfato de hierro y DMPO (1-óxido de 5,5-dimetil-pirrolina), y se lleva a cabo entonces el ensayo de EPR. Las señales resultantes sirven como control. Se añade la píldora cardiotónica en el grupo de tratamiento.

15

(2) Producción de aniones superóxido. Se monta un modelo de ensayo basado en la reacción de xantina-xantina oxidasa. Se mezclan xantina, ácido dietilentriaminapentaacético, DMPO y xantina oxidasa, y se lleva a cabo entonces el ensayo de EPR. Las señales resultantes sirven como control. Se añade la píldora cardiotónica en el grupo de tratamiento.

20

Se ensayan 10 muestras por cada uno de los 4 grupos, y los resultados se expresan en términos de media. Se aplica la prueba t en el análisis estadístico.

25 Resultados:

(1) Acción de la píldora cardiotónica en la eliminación de radicales hidroxil producidos por el sistema $H_2O_2-Fe^{2+}$. Se generará un aducto de DMPO-OH cuando un radical hidroxil es capturado por un DMPO. El valor máximo de los aductos en el grupo de control es $11,8 \pm 0,6$ unidades relativas, mientras que en el grupo de la píldora cardiotónica es $4,1 \pm 0,5$ unidades relativas. Hay una diferencia significativa entre ellos ($p<0,01$), y la tasa de eliminación de la píldora cardiotónica es aproximadamente 65%.

30

(2) Acción de la píldora cardiotónica en la eliminación de aniones superóxido producidos por el sistema de xantina-xantina oxidasa. Se generará un aducto DMPO-OOH cuando un anión superóxido es capturado por un DMPO. El valor máximo de los aductos en el grupo de control es $10,6 \pm 0,67$ unidades relativas, mientras que las señales espectrales en el grupo de la píldora cardiotónica desaparecen completamente. En comparación con el grupo de control, hay una diferencia significativa ($p<0,01$), y la tasa de eliminación de la píldora cardiotónica es 100%.

35

Los experimentos anteriores muestran que la píldora cardiotónica tiene una acción eficaz de eliminación en los aniones superóxido producidos por el sistema de xantina-xantina oxidasa y radicales hidroxil producidos por el sistema $H_2O_2-Fe^{2+}$.

40

Efecto de la píldora cardiotónica en radicales libres en la lesión de reinfusión en la isquemia cerebral en tejido de ratas

45

Procedimiento: Se cogen 30 ratas SD, y se dividen aleatoriamente en 3 grupos, que son el grupo de operación fingido (se lleva a cabo una operación, pero los vasos sanguíneos y los nervios no se ligan), el grupo del modelo de

reinfusión en la isquemia cerebral y el grupo de la píldora cardiotónica (4 g/kg). Después de administración intraperitoneal (i.p.) continua de 3 días, y 2 h después de la administración el tercer día, las ratas se anestesian con etiluretano al 20% y sus arterias conductoras en ambos lados de sus cuellos y los nervios vagos se separan y se ligan. Después de una reinfusión de 30 min, se cortan las cabezas y se extraen los cerebros. Se cogen 5 aproximadamente 500 mg de tejidos corticales de sus cerebros izquierdos y tejidos del hipocampo en ambos lados, y se ponen en nitrógeno líquido para homogeneización. Después de formar un homogenato con disolución salina fisiológica congelada, se centrifuga el homogenato. Se coge el líquido sobrenadante y se determinan las actividades de CAT y SOD y el contenido de MAD y GSH.

10 Resultados: véase la tabla 29.

(1) Efecto de la píldora cardiotónica en la actividad de CAT y el contenido de GSH en los tejidos cerebrales. Las actividades de CAT de los tejidos de la corteza cerebral y del hipocampo y el contenido de GSH de la corteza cerebral en el grupo del modelo de reinfusión en la isquemia cerebral, son mucho menores que los del grupo de la 15 operación fingida. Tanto la actividad de CAT de los tejidos del hipocampo como el contenido de GSH de la corteza cerebral en el grupo de la píldora cardiotónica son significativamente mayores que los del grupo del modelo.

Tabla 29. Actividades de CAT y SOD y contenido de MDA y GSH en los tejidos cerebrales de ratas (mPa, x ± s) (n=10)

Grupos	Actividad de CAT (U/mg de proteína)		GSH (µmol/mg de proteína)		Actividad de SOD (U/mg de proteína)		MDA (nmol/mg de proteína)	
	Corteza cerebral	Hipocampo	Corteza cerebral	Hipocampo	Corteza cerebral	Hipocampo	Corteza cerebral	Hipocampo
Grupo de operación fingida	2,94 ± 0,17	2,78 ± 0,14	18,49 ± 0,70	16,87 ± 0,92	14,24 ± 0,90	20,34 ± 0,74	0,502 ± 0,054	1,084 ± 0,117
Grupo del modelo	2,17 ± 0,24 ^a	1,97 ± 0,23 ^b	14,76 ± 1,12 ^b	13,80 ± 0,74	10,44 ± 0,79 ^b	18,18 ± 0,62 ^b	0,718 ± 0,070 ^b	1,449 ± 0,140 ^b
Grupo de píldora cardiotónica	2,55 ± 0,35	2,79 ± 0,21 ³	17,14 ± 0,76	15,76 ± 1,18 ³	13,31 ± 0,77 ³	20,59 ± 0,59 ³	0,483 ± 0,065 ³	1,069 ± 0,131 ³
Nota: En comparación con el grupo de operación fingida, *p<0,05; en comparación con el grupo del modelo, #p<0,05								

(2) Efecto de la píldora cardiotónica en la actividad de la SOD y el contenido de MDA en tejidos cerebrales. La actividad de la SOD en los tejidos cerebrales en el grupo del modelo es significativamente inferior que en el grupo de operación fingida, mientras que el contenido de MDA es significativamente mayor. Las actividades de SOD en los tejidos de la corteza cerebral y del hipocampo en el grupo de la píldora cardiotónica aumentan significativamente, mientras que el contenido de MDA disminuye significativamente.

Conclusión: Después de reinfusión en la isquemia cerebral, el contenido de MDA en los tejidos cerebrales aumenta, mientras que el contenido de GSH disminuye. Las actividades de la CAT y SOD, dos enzimas importantes para la eliminación de radicales libres de oxígeno en los tejidos, disminuyen significativamente, lo que muestra que durante el desarrollo de la reinfusión en la isquemia cerebral, se produce una gran cantidad de radicales libres de oxígeno debido al fallo de la función del sistema de eliminación de radicales libres. Esto conduce a la peroxidación lipídica, y conduce entonces a la lesión cerebral. La píldora cardiotónica puede disminuir el contenido de MDA en los tejidos de la corteza cerebral y del hipocampo de ratas reinfundidas y aumentar el contenido de GSH y las actividades de la CAT y SOD mucho, lo cual muestra que la píldora cardiotónica tiene las funciones de restringir notablemente las reacciones de los radicales libres del oxígeno, controlar la peroxidación lipídica y proteger las células del cerebro dañadas por la reinfusión isquémica.

Antioxidación de la píldora cardiotónica en la lesión hepática crónica. Procedimiento: Se adopta el modelo de lesión hepática crónica leve inducida por bajo contenido de proteínas, alto contenido de grasas y CCL4 de la rata Wistar. En el grupo de la píldora cardiotónica, se perfunde la píldora cardiotónica en el estómago de las ratas con una dosis de 4 g/kg, mientras que en los grupos normal y del modelo, se perfunde la misma cantidad de disolución salina fisiológica. La actividad de la SOD se determina usando el procedimiento de la xantina oxidasa, mientras que el contenido de MDA se determina usando el procedimiento del ácido tiobarbitúrico mejorado.

Resultados: véase la tabla 30. Comparando el grupo del modelo con el grupo normal, la actividad de la SOD se degrada mientras que aumenta la del MDA. Sin embargo, en el grupo de la píldora cardiotónica, la actividad de la SOD aumenta, mientras que la del MDA se degrada, haciendo que el grupo de la píldora cardiotónica vuelva a la normalidad.

Tabla 30. Actividades de SOD y contenido de MDA en la lesión hepática crónica

Grupos	Ratas	SOD (NU/mg.pr)	MDA (nM/mg.pr)
Grupo normal	12	1,717 ± 0,521	15,21 ± 4,35
Grupo del modelo	12	1,326 ± 0,3218	19,39 ± 4,62*
Grupo de la píldora cardiotónica	11	1,710 ± 0,415#	15,16 ± 4,29#

Nota: En comparación con el grupo normal, *p<0,05. En comparación con el grupo del modelo, #p<0,05

Conclusión: El MDA es un producto de degradación principal de la peroxidación lipídica. El MDA puede dañar mucho la estructura de la membrana celular y después las células hepáticas. La SOD es un depurador de radicales libres de aniones superóxido, y puede restringir la peroxidación lipídica producida por radicales libres. La píldora cardiotónica puede aumentar significativamente la actividad de la SOD y disminuir el contenido de MDA, lo que degradará el nivel de la peroxidación lipídica y aligera la lesión hepática.

La DSP no es mutagénica.

Se examinó si la DSP es mutagénica en el ensayo de Ames. La DSP no es mutagénica. Véase la siguiente tabla 31.

Tabla 31. Mutagenicidad de la DSP (ensayo de Ames)

	S9	número de colonias por disco			
		TA97	TA98	TA100	TA102
DSP	-				
0,0	-	141 ± 13	36 ± 3	161 ± 21	303 ± 44
0,5	-	140 ± 17	35 ± 2	148 ± 21	288 ± 15
5	-	136 ± 14	34 ± 4	154 ± 26	280 ± 16
50	-	133 ± 20	33 ± 5	142 ± 25	292 ± 37
500	-	109 ± 15	34 ± 3	154 ± 16	311 ± 32
5000	-	67 ± 8*	30 ± 4	149 ± 27	298 ± 32
0,0	+	141 ± 13	44 ± 6	176 ± 19	296 ± 39
0,5	+	148 ± 13	42 ± 9	161 ± 27	296 ± 37
5,0	+	152 ± 11	44 ± 7	161 ± 16	292 ± 38
50,0	+	140 ± 18	37 ± 6	166 ± 9	307 ± 55
500,0	+	135 ± 21	42 ± 7	152 ± 22	287 ± 16
5000,0	+	119 ± 17	38 ± 7	162 ± 17	363 ± 57
Dexon					
50	-	2155 ± 814	952 ± 187	831 ± 114	1510 ± 211
2-AF					
40	-	125 ± 18	38 ± 3*	161 ± 16	
	+	1404 ± 644*	1598 ± 124	1222 ± 309	
DAN					
100	-	364 ± 50			
	+	943 ± 102*			

5 Producción de fármacos brutos

1. Dan Shen

(1) Control de calidad

10

Se tomaron muestras del fármaco Dan Shen bruto de diferentes zonas de producción de China. Se llevó a cabo el análisis químico de sus componentes principales en las muestras de diferentes bases. Los resultados mostraron que la calidad de Dan Shen de una zona llamada Shangluo era la mejor de todas y probaron que el clima de Shangluo es el más adecuado para cultivar Dan Shen. Los principios activos de Dan Shen tales como tansinona y ácido salviánico A, fueron aprobados como los mejores en calidad.

15

(2) Topografía

Shangluo está situado geográficamente a 108°34'20" ~111°1'25" longitud este y 33°2'30"~ 34°24'40" latitud norte, con un nivel medio sobre el nivel del mar de 900 metros. La región es una zona de alta montaña baja y media y sin polución. El aire limpio sin polución hace que sea ideal para el cultivo de plantas medicinales.

20

(3) Clima

Tiene un clima cálido y semihúmedo, típico de zonas montañosas de zona de transición de subtropical a zona templada. Está afectada por los monzones del sudeste, tiene claras divisiones en estaciones y una gran cantidad de lluvia. Las precipitaciones en forma de lluvia anuales en esta zona se calcula que son 733,9-899 mm. El periodo de insolación es de 1874,1-2185 horas al año, con una irradiación de sol anual de 119,57-124,36 kilocalorías/cm². La temperatura varía de 18°C-40,8°C. El periodo sin heladas dura 198-218 días al año.

25

30

(4) Suelo

El 80% del suelo en Shangluo es arenoso, la mayor parte de la tierra cultivable está compuesta de suelo neutro y alcalino con un valor de pH de 6,5-8. En los 0-20 cm de la capa de laboreo, los nutrientes del suelo consisten en los siguientes: 1,36% de materia orgánica; 0,085% de nitrógeno; 18 ppm de fósforo rápido-eficaz; 136 ppm de potasio

35

rápido-eficaz y 60 ppm de nitrógeno alcalino-hidrolizado. Los metales pesados y otras materias tóxicas contenidas en el suelo no superan los estándares agrícolas establecidos en el país. La región es rica en plantas y animales. Los agricultores locales usan fertilizantes orgánicos.

5 (5) Metales pesados:

Los ocho metales, incluyendo plomo, cadmio, mercurio, arsénico, etc., los restos de pesticidas, el aire y el agua cumplen todos los estándares medioambientales del país.

10 (6) Normalización

La plantación y labranza de Dan Shen siguen el estándar de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). El conocimiento técnico relevante para el cultivo de Dan Shen se recopila en folletos y se distribuye entre los cultivadores de Dan Shen en la base. Durante las estaciones de siembra, se envían técnicos a los campos para dar a los agricultores formación sobre el terreno y ofrecer asistencia técnica, con el fin de normalizar la plantación de Dan Shen en una escala de tipo gran plantación.

(7) La base de producción de Shangluo ha cultivado y reproducido 20 variedades diferentes de Dan Shen. Se observaron y compararon diferentes Dan Shen en sus emplazamientos de cultivo, rendimiento, aspecto y componentes químicos, durante 3 años. Las mejores variedades en calidad se eligieron para la plantación a gran escala.

(8) Se adoptaron el cultivo tisular y la tecnología de clones en el cultivo de Dan Shen para acelerar el procedimiento y acortar el círculo de crecimiento.

25

(9) Después de un periodo de 30 días de plantación en tubo de ensayo, se usa un procedimiento de reproducción ampliado. Transcurren 40 días antes del periodo de enraizamiento. El periodo de enraizamiento tardará otros 10 días, para que las plantas generen y enriquezcan sus raíces. La tasa de enraizamiento normalmente alcanza 90% o superior. Después la planta se puede transferir al vivero, donde el dispositivo de riego por aspersión y las condiciones avanzadas están controladas por tecnología integrada por ordenador. Las plantas se pueden trasplantar al campo exterior después de un mes de cultivo en el vivero.

30

(10) Según los expertos, el Dan Shen cultivado a partir de la base de producto de los autores de la invención no solo tiene una alta calidad, sino también alta producción por sus raíces productivas (50% más en peso de la raíz que los de otras zonas) y alta composición química (70% mayor en principios activos que muestras de otros sitios).

35

2. Borneol natural

(1) Condiciones de cultivo

40

Las zonas de cultivo del borneol natural son la comarca de Xinghuang en la provincia de Hunan, China, una región de colinas de media altura a 300-600 m sobre el nivel del mar. 60% de la zona está cubierta de bosque. La tierra consiste en suelo de arena amarilla y roja con pH 5-6. No se encuentra contaminación del aire ni del agua en esta región.

45

(2) Características biológicas de los árboles

Capacidad de crecimiento extremadamente fuerte, crece en sotobosque, 300-400 árboles por mu (igual a 666,7 m²); se recogen las partes por encima de las hojas de las ramas; la ganancia neta es 1000 kg por mu.

50

(3) Reproducción y trasplante

Se usa la tecnología de injerto y corte para la reproducción. La planta crece en el vivero durante el primer año y se trasplanta al campo en la primavera del segundo año. Es necesario fertilizar y escarificar periódicamente el campo.

55

(4) La planta puede crecer hasta 30 cm de altura y 80-100 cm de diámetro mayor. Contiene alcanfor natural en diferentes partes de la planta: hojas, ramas, tronco y raíces. Entre ellas, las hojas tienen el mayor contenido de alcanfor.

60 (5) El árbol del alcanfor de tipo borneol de Xinghuang es una de las variedades naturales de *Cinnamomum*

glandullferm (wall) Noes. Los árboles del alcanfor varían en contenido de alcanfor y borneol. Algunos tienen bajo contenido en borneol y alto en alcanfor, mientras que otros tienen alto contenido en borneol y bajo en alcanfor. Mediante un ensayo con una gran cantidad de muestras y muchos análisis de HPLC, los autores de la invención finalmente escogieron un tipo de árboles del alcanfor que contiene alrededor de 80% de borneol con menos impurezas.

3. *Radix Notoginseng*

a. Semillas de la planta

10

(1) Determinación de *Radix Notoginseng*

Con la reacción de la PCR para marcado de masa molecular, se puede observar la tinción de *Radix Notoginseng*. *Radix Notoginseng* tiene su huella dactilar de ADN característica.

15

(2) Forma y propiedades

La semilla de *Radix Notoginseng* tiene un cuerpo redondo, circular. Para semillas de diferente periodo de crecimiento, *Radix Notoginseng* tiene semillas de 2 años o 3 años. La semilla de 2 años tiene 0,45-0,55 cm de diámetro y 95-103 g de peso, para el grano seco. Las semillas de 3 años tienen 0,54-0,65 cm de longitud y 98-109 g de peso para el grano seco.

20

(3) Temperatura adecuada para que broten las semillas

25 La temperatura adecuada para que broten las semillas es 10-30°C, la temperatura ideal es 15-20°C.

(4) Contenido de agua

La cantidad de agua contenida debe ser 60-70%, si el contenido de agua es inferior a 20°C durante un periodo de tiempo largo, las semillas pierden viveza.

30

(5) Reposo vegetativo

Las semillas tienen tendencia a pasar por un reposo vegetativo durante 45-60 días después de recolección.

35

(6) Vida útil

Las semillas tienen una vida útil de 15 días en estado natural después de recogerlas

40

(7) Requisitos para el almacenamiento de las semillas

Las semillas para almacenar deben recogerse de las plantas que han crecido más de dos años, y el árbol debe estar creciendo de forma próspera en las partes por encima de la tierra y sin plaguicidas. Se recomienda recoger las semillas de plantas de 3 años.

45

(8) Tratamiento del campo de recepción de semillas

Los campos de recepción de semillas deben tratarse mejor que los campos de producción normales, las plantas contaminadas deben desecharse en todo momento, las plagas no deben ponerse en contacto con las yemas bajo ninguna circunstancia. Durante el periodo de brotado de las yemas y las hojas, se debe pulverizar dos veces 3000 ppm de YunDa-120 y disolución de 400 veces de fertilizante biológico Yang Kang. Y durante la florescencia y el periodo de fruto, se pulveriza fitoquinina.

50

(9) Periodo de recolección de las semillas

55

El periodo de recolección de las semillas de *Radix Notoginseng* es desde finales de octubre a primeros de diciembre.

(10) Procedimientos para la recolección de semillas

60

La recolección de semillas se decide dependiendo de los niveles de madurez de las semillas. Las semillas de los árboles que crecen más fuertes se recogerán y almacenarán por separado. La base prohíbe estrictamente la recolección de plantas inmaduras.

5 (11) Procesado

Las plantas se lavan inmediatamente después de la recolección, mientras que las pulpas y semillas deterioradas se separan. Las plantas se secan al sol después de lavado.

10 (12) Almacenamiento

Utilizar disolución de 300 veces de líquido soluble de compuesto manganoso con sales de cinc y metalaxil al 58% para tratar las semillas de *Radix Notoginseng* durante 30 min, dejar que se seque la superficie de las semillas, y almacenar las semillas con arena húmeda que contiene 20% de agua. Es una etapa crucial para el procedimiento.

15

(13) Envasado

Los productos finales se envasan en contenedores no contaminados. Debe haber signos que indiquen la fecha de recolección, procesado y el número de lote del producto.

20

(14) Transporte

Deben usarse vehículos de transporten limpios, a prueba de agua y ventilados para el transporte con el fin de prevenir que el producto se contamine con materias tóxicas. Si el transporte dura más de 8 h, el producto de semillas debe estar con la arena húmeda.

25

(15) Ensayo de la vitalidad de las semillas.

Se usan los procedimientos de TTC: se pesa con precisión 1 g de polvo de tetrazolio y se disuelve en 1000 ml de agua destilada para formar la disolución de TTC al 0,1%. Se sumerge la muestra en la disolución y se mantiene durante 24 h, se saca y corta por la mitad y se pone una mitad en un disco de cultivo. Se usa la disolución de TTC al 0,1% preparada para teñir la muestra durante 30 min. La vitalidad de las semillas se puede determinar por el color de las semillas.

30

35 (16) Inspección de plagas

i. Observar las semillas a simple vista poniendo 500-1000 pellets de muestra en una hoja de papel blanco o vidrio. Si aparecen manchas inusuales o plagas en la superficie de la muestra, se puede decidir que están contaminadas. Las muestras contaminadas deben apartarse y debe identificarse su nivel de contaminación.

40

ii. Cortar e inspeccionar: se usa un escalpelo para cortar y abrir 2 grupos de muestras que contienen 100 semillas cada una. Se calcula el número de semillas contaminadas para determinar el nivel de contaminación.

iii. Oler para inspeccionar las muestras: se ponen en la mano y se detecta mediante el olfato cualquier olor a moho. O simplemente se deja la muestra en una copa que contiene agua calentada (60-70°C), se cubre durante 2-3 min, se vierte el agua y se huelen las semillas. Las semillas deben desprender una fragancia delicada, si no, probablemente están contaminadas.

45

(17) Inspección del color

50

Una semilla no contaminada debe tener color amarillo pálido y blanco.

(18) Inspección con microscopio

Se seleccionan 5 grupos de muestras de ensayo aleatorias (cada muestra contiene como mínimo 50 semillas), se ponen las muestras en un disco de cultivo durante 24 h. Se observan al microscopio para detectar cualquier bacteria patógena, si se detecta, se calcula el nivel de contaminación.

55

b. Plántulas de la planta

60

(1) Temperatura para brotar

La temperatura para que brote *Radix Notoginseng* es 1-20°C, la temperatura ideal es 15°C.

5 (2) Contenido de agua

El contenido de agua del suelo usado para las plántulas es 20-25%.

(3) Almacenamiento

10

El desarrollo de *Radix Notoginseng* para que broten las yemas en reposo requiere 90 días de periodo vegetativo. 100 ppm de giberelina pueden ayudar a acortar el periodo vegetativo de *Radix Notoginseng*.

(4) Refinado

15

El periodo de refinado de *Radix Notoginseng* es desde principios de diciembre hasta finales de enero. Durante el refinado las raíces deben manejarse con cuidado. Plantar inmediatamente después de refinado.

(5) Transporte

20

Radix Notoginseng no se puede transportar largas distancias, ya que se dañaría. Si es inevitable, debe colocarse *Radix Notoginseng* en un recipiente ventilado con suelo, sin exposición directa a la luz del sol.

(6) Inspección de la calidad

25

i. Para el peso por unidad, se eligen 300-500 plántulas como muestras, se ponen 100 plántulas en cada grupo, se pesan en la balanza y se calcula el peso unitario.

30

ii. Para la inspección de plaguicida: se forman 4 grupos de muestras que contenga cada uno 100 plántulas. Se ponen las muestras en un disco de vidrio y se observan las muestras a simple vista o con lupas de 5-10 aumentos para comprobar los plaguicidas.

35

iii. Se forman 4 grupos de muestras que contengan 100 plantas cada una, se cortan las muestras en rodajas para observarlas al microscopio.

c. Cultivo de las plántulas

(1) Condiciones del campo

40

Las plántulas de *Radix Notoginseng* se cultivan en las zonas mejor acondicionadas. La base usa el procedimiento de cultivo centralizado y cultivo a gran escala.

(2) Entorno

45

La zona está totalmente exenta de contaminantes. La calidad del aire es superior al nivel 2 del estándar GB 3059-96.

(3) Recursos de agua

50

Los recursos de agua consisten en el agua de lluvia, agua subterránea, y agua corriente natural. La calidad del agua en esta zona es controlada con el estándar GB 5084-92.

(4) Suelo

55

Radix Notoginseng no se puede plantar en suelo cenagoso, la cantidad de metales pesados en el suelo elegido para *Radix Notoginseng* debe estar dentro del estándar pertinente del país.

(5) Suelo ideal

60

Para un buen resultado esperado, los autores de la invención eligen un suelo ácido (pH 5,5-7,0) con una pendiente

ES 2 403 240 T3

no mayor de 15°. Una altura no superior a 1600 sobre el nivel del mar debe tener una insolación de 8-12%, y una altura superior a 1600 m sobre el nivel del mar debe tener una insolación de 10-20%.

(6) Temperatura

5

Durante el periodo de brotado, la temperatura atmosférica debe ser de 20-25°C, y la temperatura de la tierra de 10-15°C. Durante el periodo de cosecha, la mejor temperatura atmosférica es 20-25°C y la mejor temperatura del suelo es 15-20°C.

10 (7) Contenido de agua

El contenido de agua del suelo debe ser 25-30%.

(8) Preparación del suelo

15

El arado del suelo debe repetirse 3 veces antes de plantar, y el suelo debe exponerse a la luz del sol, para ayudar a exterminar las sustancias bacterianas del suelo.

(9) Tratamiento del suelo

20

Para prevenir el daño de las raíces, se usan 75-100 g de cal por metro cuadrado antes del trasplante.

(10) Construcción y tratamiento del toldo

25 El toldo está a 1,8 m por encima del suelo con una zanja de 2 m de profundidad por debajo del suelo. La mejor penetración de la luz del sol es de 8-10% si está en una zona de no más de 1600 m sobre el nivel del mar, o de 10-15% si está a más de 1600 m. El suelo debe ser plano; la capa profunda de tierra debe estar suelta; mientras que el nivel superficial de la tierra debe ser rígido. La mejor estación para plantar es de finales de diciembre a finales de enero. Antes de plantar, las semillas se deben sumergir en compuesto metaxílico y cinc al 58% (500-800x) o antimicina al 1,5% (200 ppm) durante 30-50 min y sacarlas para dejarlas secar. Esto es para proteger la planta de enfermedades (las semillas recubiertas no tienen que pasar los procedimientos anteriores). La densidad de la plantación es 4 x 5 cm o 5 x 5 cm, con 100-200 mil semillas por mu (666,7 m²) de tierra. Se usan herramientas especiales para crear un canal poco profundo y se usa maquinaria o las manos para sembrar y plantar. Las semillas se cubren completamente con una capa fina de suelo.

35

Después se llevan a cabo las tareas de fertilización, riego y escardadura. Las malas hierbas deben eliminarse siempre. Si el toldo se rompe, debe repararse inmediatamente y asegurarse de la penetración correcta de la luz del sol. Los fertilizantes naturales incluyen residuos de aves de corral, polvo de horno y polvo de huesos (no deben aplicarse residuos humanos).

40

d. Cultivo de *Radix Notoginseng*

(1) Topología

45 Lo mejor es que el suelo tenga una pendiente moderada inferior a 15° y una buena exposición al sol.

(2) Textura del suelo

Lo mejor es que el suelo esté profundamente asentado con suelo suelto y arena.

50

(3) El pH del suelo debe estar en 5,5-7.

(4) Cultivos plantados previamente

55 Se planta previamente maíz, trigo y judías en los nuevos campos para evitar la destrucción del suelo.

(5) Nivel del mar

60 A 1400-1800 m sobre el nivel del mar, cerca de una latitud de 23,5° es la situación más adecuada de la zona para cultivar *Radix Notoginseng*.

(6) Insolación

Radix Notoginseng es un tipo de planta que requiere solo una insolación de 8-20%. La cantidad de insolación debe 5 variarse con respecto a los diferentes periodos de su crecimiento. Sin embargo demasiada exposición solar producirá la paralización de las plantas.

(7) Contenido de agua

10 El contenido de agua en el suelo debe ser 25-30%.

(8) Fertilizante

Se usan fertilizantes orgánicos junto con fertilizantes de compuestos, fertilizantes de micronutrientes o fertilizantes 15 de oligoelementos.

(9) Temperatura

La temperatura media se calcula que es 15-18°C durante el año en la zona de *Radix Notoginseng*. Durante el 20 periodo de brotado, la temperatura atmosférica debe ser, lo más adecuado, de 20-25°C, la temperatura del suelo de 15°C. Durante el desarrollo de nutrientes y periodo de floración, la temperatura se mantiene mejor a 25°C. Si la temperatura es inferior a 15°C, se afectará a la florescencia.

(10) División del campo

25

Antes del cultivo, el campo debe ararse y soltarse 3 veces hasta que la estructura queda pulverizada.

(11) Tratamiento del suelo

30 Antes de la siembra y trasplante, aplicar 75-100 g de cal viva para propósitos de esterilización.

(12) Estándares del lecho

Lecho de suelo de tierra plano de 20-25 cm de altura, y en la zona de pendiente debe ser 15-20 cm. La anchura del 35 lecho es entre 120 y 140 cm en forma de baldosa. El suelo en la parte inferior de la base debe estar suelto y en la parte superior debe ser sólido, esto es para una mejor penetración.

(13) Inmersión de las semillas

40 Durante el trasplante sumergir las semillas durante 30-50 min en metalaxilo al 58% (500-800x) y después dejarlas secar, esto evitará que la planta tenga enfermedades y elimina plagas.

(14) Densidad de la plantación

45 Mantener una distancia de 10 x 12,5 cm - 10 x 15 cm de densidad de plantas. Es decir 26-32 plantas por mu (666,7 m²)

(15) Procedimientos de trasplante

50 Las plántulas se plantan en la misma dirección con propósitos de tratamiento. En el caso de suelos con pendiente, las plántulas se plantan desde el extremo más bajo al más alto de tierra. La primera fila de plántulas está mirando hacia arriba mientras que la segunda fila mira hacia abajo. Las yemas también miran hacia arriba y la parte inferior mira hacia dentro.

55 (16) Cubrimiento del suelo

Utilizar suelo en polvo, suelto y humedecido para cubrir las plántulas completamente, sin exponer las raíces o las yemas.

60 (17) Fertilización

Utilizar residuos de aves de corral, cenizas de horno, cenizas de huesos, fosfato de calcio y magnesio, etc. como fertilizante especializado.

5 REFERENCIAS

1. Patente de EE.UU. n° 5288485 "vasodilating agent"
2. Patente de EE.UU. n° 5433957 "vasodilating agent"
3. Patente de EE.UU. n° 5776463 "Method of reducing stress and circulatory heart disease with freeze-dried borage petal extracts"
- 10 4. Yang GY y col., "Clinical studies on the treatment of coronary heart disease with Valeriana officinalis varlatifolia" *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 14(9):540-2, 1994
5. Wu Y, "Clinical study on Xintongkang capsule in treating angina pectoris of coronary heart disease" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 10(7):395-8, 1990.
- 15 6. Liu KY y col., "Clinical observation on treatment of 45 angina pectoris patients of coronary heart disease with taponin" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 15 (11) :649-51, 1995.
7. Hu JX y col., "Clinical and experimental study of shenshao tongguan pian in treating angina pectoris of coronary heart disease" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 10(10) :596-9, 1990.
8. Li Y y col., "Effects of Kuo-guan granule on plasma zinc, copper and erythrocyte GSH-Px (glutathione peroxidase)
- 20 in patients with angina pectoris" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 10(6):348-50, 1990.
9. Wang B y col., "406 cases of angina pectoris in coronary heart disease treated with saponin of Tribulus terrestris" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 10(2):85-7, 1990.
10. Jin C y col., "Effect of Astragalus membranaceus on erythrocyte sodium content and sodium transport in the coronary heart disease" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 11(11):651-3, 1991.
- 25 10. Jiang HW y col., "Clinical study in treating qi-deficiency and blood-stasis syndrome of angina pectoris with qi xue granule" *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 12(11):663-5, 1992
11. Wang XF y col., "Clinical observation of wenxin decoction in treating 82 patients with spontaneous angina pectoris" *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 16(4) :201-3, 1996.
12. Lei ZY y col., "Action of Astragalus membranaceus on left ventricular function of angina pectoris" *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 14(4):199-202, 1994.
- 30 13. He W y col., "Effects of Kuo guan powder on immunologic functions in patients with ben-xu biao-shi syndrome in ischemic heart disease" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 9(4):213-5, 1989.
14. Chen K y col., "Clinical study on the effect of shuxuening tablet in treatment of coronary heart disease" *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 16(1):24-6, 1996.
- 35 15. Zhang H y col., "Clinical study on effects of buyang huanwu decoction on coronary heart disease" *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 15(4):213-5, 1995.
16. Zhang XL y col., "Preliminary study of rose shu-xin oral liquid in the treatment of angina pectoris in coronary heart disease" *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 12 (7) :414-6, 1992.
17. Hu JX y col., "Clinical and experimental study of shenshao tongguan pian in treating angina pectoris of coronary
- 40 heart disease" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*
18. Zhu W y col., "Protective effect of danshen during myocardial ischemia and reperfusion: an isolated rat heart study" *American Journal of Clinical Medicine*, 18(1-2):19-24, 1990.
19. Li YY, "Clinical and experimental study on the effect of xue mai tong on coronary heart disease" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 9(2):79-81, 1989.
- 45 20. Cai PY y col., "A clinical study of hehuantang in treating coronary heart disease" *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 16(4):204-6, 1996.
21. 22. Lin QC, "A clinical study of guan mai le in the treatment of coronary heart disease" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 9(5):280-2, 1989.
22. Li SQ y col., "Clinical observation on the treatment of ischemic heart disease with Astragalus membranaceus"
- 50 *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 15(2):77-80, 1995.
23. Lu BJ y col., "Effect of sheng mai san on lipid peroxidation in acute myocardial infarction patients" *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 14(12):712-4, 1994
24. Wang S y col., "Effects of Codonopsis pilosulata on the synthesis of thromboxane A2 and prostacyclin" *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 10(7):391-4, 1990.
- 55 25. Guan M y col., "Observation on the treatment of coronary heart disease by kuo guan qu yu ling" *Journal of Traditional Chinese Medicine* 10(1):49-53, 1990.
26. "Fufang Danshen Pian" Pharmacopeia of the People's Republic of China. English Edition 1997. Volume 1,280.
27. Zhu HG, "Clinical study on xinkening in treating asymptomatic myocardial ischemia in coronary heart disease" *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 14(4):213-5, 1994.
- 60 28. Chiang WT y col., "Effects of "Danshensu" and other two water-soluble components of salvia miltiorrhiza on dog

- ischemic myocardium and isolated pig coronary artery" *Acta Acad Med Prim Shanghai* 1982; 9: 13-19.
29. Sun Xi-ming y col., "Studies on a new pharmacological action of an extract of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*)" *Chin. Med. Herb.* 1991; 22:20-23.
30. Chen ZH y col., "Studies on effects of "Danshensu" on experimental microcirculatory disturbances and plasm lactic acid concentrations" *Acta Acad Med Prim Shanghai* 1987; 14: 25-29.
- 5 31. Huang C y col., "Effects of Panax Notoginseng Saponins on myocardial ischemia and reperfusion injury in conscious rabbit" *Chin. Bull. Pharmacol.* 1991; 7: 190-3.
32. Shi L y col., "Effects of total saponins of Panax Notoginseng on increasing PGI2 in carotid artery and decreasing TXA2 in blood platelets" *Acta Pharmacol. Sin.* 1990; 11: 29-32.
- 10 33. Xu W y col., "Effect of menthol and borneol on the distribution of sulfadiazine sodium and Evan's blue in the rat and mouse brain" *Pharmacol. Chin. Med. Clin.* 1995; (6): 31-33.
34. Chen TF y col., "Enhancement of absorption of tetramethylpyrazine by synthetic borneol" *Acta Pharmacol. Sin.* 1990; 11:42-44.
35. Li X y col., "Protective effects of Panax notoginseng saponins on experimental myocardial injury induced by ischemia and reperfusion in rat" *Acta Pharmacol. Sin.* 1990;11:26-29.
- 15 36. Pan JG y col., "Chemical Studies on Essential oils from six Artemisia Species" *Chin. J. Chin. Mater Med.* 1992; 17: 741-6.
37. Wu YZ y col., "An assessment of Radix *Salviae Miltiorrhizae* in promoting blood circulation by removing blood stasis" *Acta Nanjing Univ Trad Chin Mater Med* 1995; 11:35-6.
- 20 38. Wang NS y col., "Experimental studies of "Benefits of Borneol as an Assistant or a guide," *J. Trad. Chin. Med.* 1994; 35:46-7.
39. Li CZ y col., "Anti-coagulation effect of Radix *Salviae Miltiorrhizae*" *Chin. J. Integr. Med.* 1983; 3: 297-9.
40. Li CZ y col., "An experimental study on thrombotic inhibition effect of Radix *Salviae Miltiorrhizae*" *Acta Acad. Med. Prim. Shanghai* 1979;6:145-9.
- 25 41. Mo QX y col., "Dynamics of 3H-Borneol" *Propriet. Trad. Chin. Med. Res.* 1982; 8 : 5-7.
42. Zheng RX y col., "Preservation effect of Radix *Salviae Miltiorrhizae* on myocardial ischemia induced by coronary ligation in mice" *Chin. J. Integr. Med.* 1992;12:424-6.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una píldora Dan Shen (DSP) para usar en el tratamiento de la angina de pecho crónica estable, que comprende las etapas de:

- 5
- a) Extracción de *Radix Salviae Miltorrhizae* y *Panax Notoginseng* por separado en agua caliente a reflujo y filtración por separado;
- 10
- b) Concentración de los filtrados por separado;
- c) Refinado de los concentrados por separado usando columnas de resina y concentración, y obtención del extracto soluble en agua refinado de *Radix Salviae Miltorrhizae* y el extracto soluble en agua refinado de *Panax Notoginseng*
- 15
- d) Mezcla de los extractos solubles en agua refinados de la etapa (c) con borneol sintético y vehículos farmacéuticos.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que

(1) La extracción de los componentes solubles en agua de *Panax Notoginseng* comprende las siguientes etapas:

- 20
- (a) Dilución de las plantas medicinales con 5-7 veces de agua;
- (b) Extracción de los componentes solubles en agua de *Panax Notoginseng* mediante ebullición en un tanque con una presión de aire entre 0,04-0,06 mPa durante 2 h;
- 25
- (c) Repetición de la extracción en las mismas condiciones durante 1,5 h;
- (d) Filtración de la extracción con una malla nº 100;
- 30
- (e) Refinado del filtrado usando resina de adsorción macroporosa eluyendo con etanol;
- (f) Concentración de los extractos eluidos en condiciones de descompresión con una entrada de aire de 0,04-0,06 mPa y vacío de -0,076~-0,088 mPa hasta que la densidad es 1,33-1,35;

35 (2) La extracción de los componentes solubles en agua de *Radix Salviae Miltorrhizae* comprende las siguientes etapas:

- (a) Dilución de las plantas medicinales con 5-7 veces de agua;
- 40
- (b) Extracción de los componentes solubles en agua de *Radix Salviae Miltorrhizae* mediante ebullición en un tanque con una presión de aire entre 0,04-0,06 mPa durante 2 h;
- (c) Repetición de la extracción en las mismas condiciones durante 1,5 h;
- 45
- (d) Filtración de la extracción con una malla nº 100.
- (e) Concentración de los filtrados en condiciones de descompresión con una presión de vacío de -0,076-0,088 mPa hasta que 1 kg de plantas medicinales inicial se convierta en 1 litro;
- 50
- (f) Precipitación de los concentrados con etanol;
- (g) Filtración de la disolución de los precipitados en etanol a través de una malla nº 100;
- (h) Concentración de los filtrados en condiciones de descompresión con una presión de entrada de aire de 0,04-0,06 mPa y presión de vacío de 0,076-0,088 mPa;
- 55
- (i) Refinado de los concentrados por cromatografía en poliamida eluyendo con etanol;
- (j) Concentrado de los extractos refinados hasta la densidad de 1,33-1,35;
- 60

(3) y que además comprende producir la píldora que consiste en las siguientes etapas:

(a) Mezcla de los extractos de *Panax Notoginseng*, los extractos de *Radix Salviae Miltorrhizae*, el borneol sintético y polietilenglicol 6000 en una relación de 4,0:20,6:1,9:79,5;

5

(b) Fusión de la mezcla;

(c) Formación de la mezcla fundida en píldoras usando la máquina de vertido con las siguientes características: la temperatura del recipiente de vertido es de forma constante 89-93°C, la disolución de enfriamiento es parafina líquida cuya temperatura es inferior a 8°C, el diámetro interior de la cabeza de vertido es 1,8 mm, el diámetro exterior de la cabeza de vertido es 2,4 mm, la distancia entre la cabeza de vertido y la superficie de la disolución de enfriamiento es 15 cm.

10

(d) Centrifugación de las píldoras a 800-1100 rpm durante 15 min para separar los aceites.

15

3. Una píldora Dan Shen para usar en el tratamiento de la angina de pecho crónica estable, que se puede obtener por el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

4. La píldora Dan Shen de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende 5-40% de ácido fenólico soluble en agua de *Radix Salviae Miltorrhizae*, 1-10% de saponina soluble en agua de *Panax Notoginseng* y 1-5% de borneol.

20

5. La píldora Dan Shen de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende 10-30% de ácido fenólico soluble en agua de *Radix Salviae Miltorrhizae*, 2-6% de saponina soluble en agua de *Panax Notoginseng* y 1-3% de borneol.

6. La píldora Dan Shen de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende de aproximadamente 0,14 a aproximadamente 0,18 mg de Danshensu por píldora, más de 12,12 µg de sanchinósido R1 por píldora y más de 56,26 µg de ginsenosido Rg1 por píldora.

25

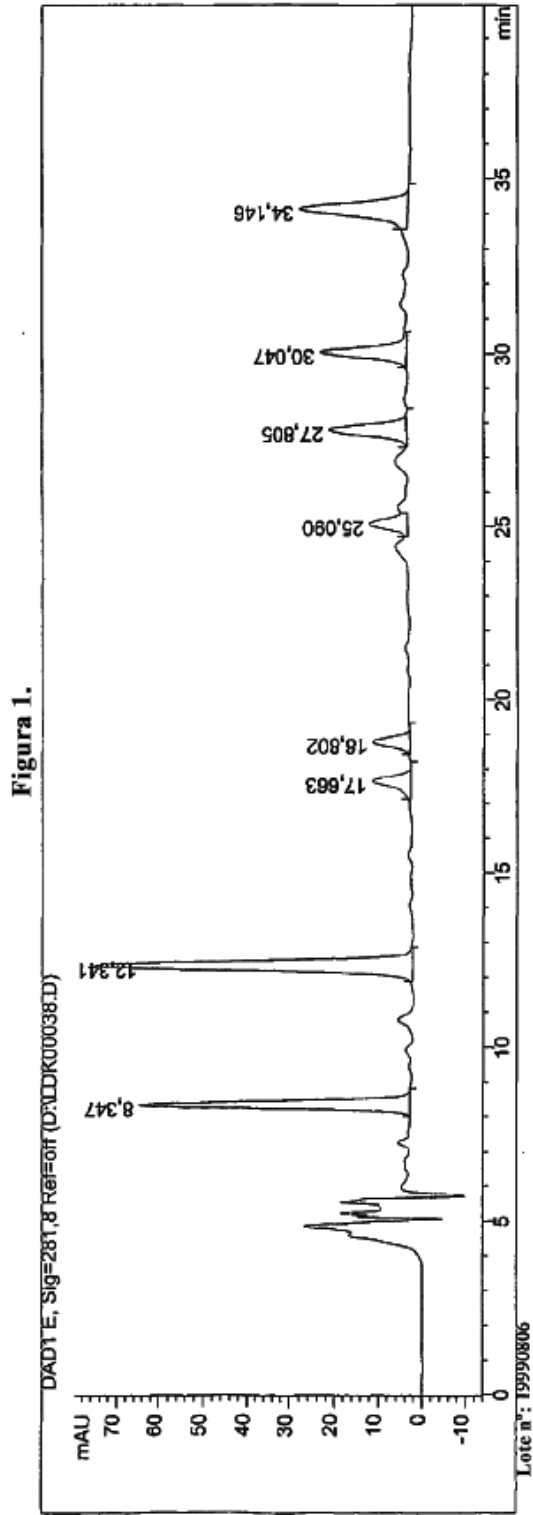


Figura 2.

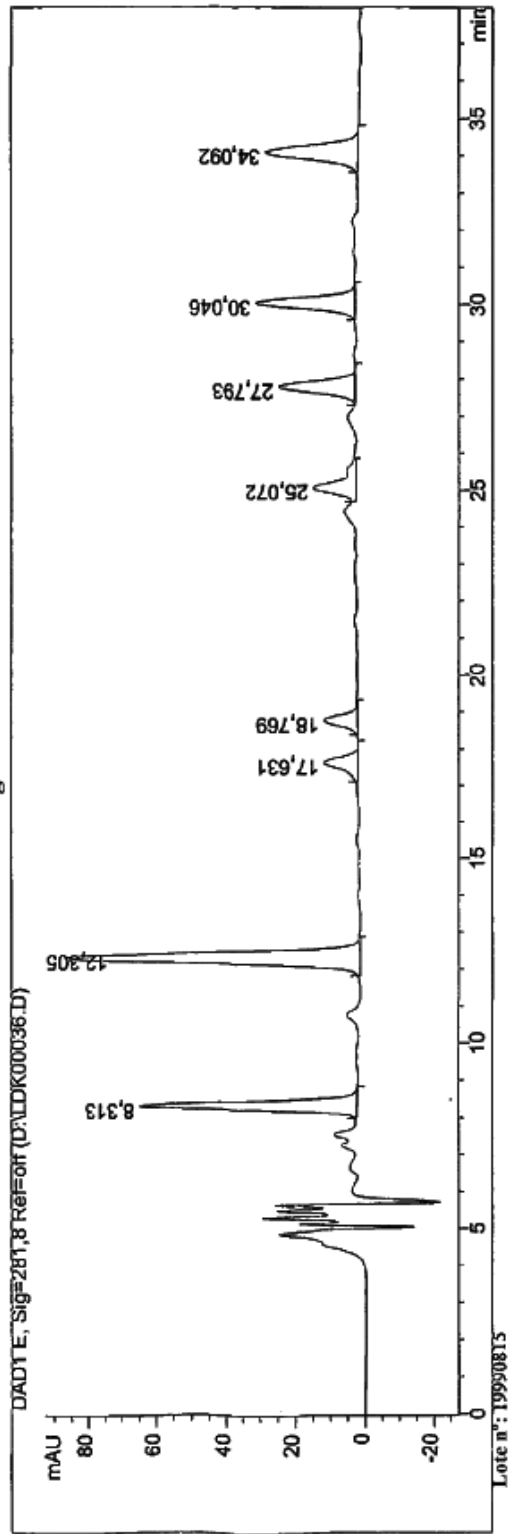
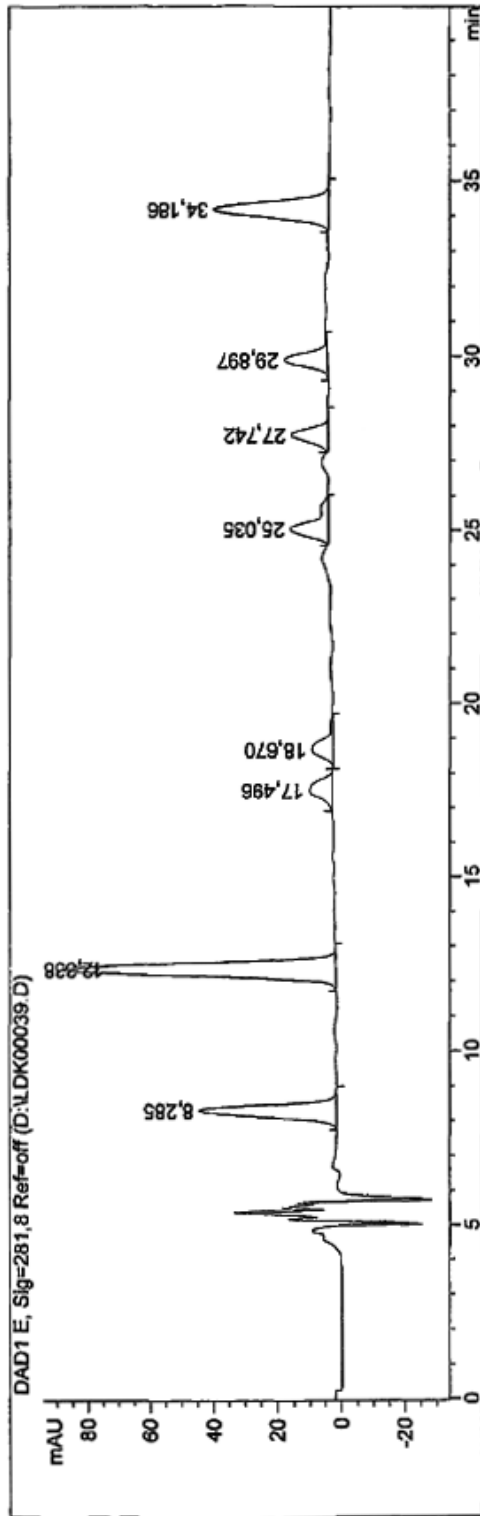


Figura 3.



Lote n°: 19990823